UNTERSUCHUNGEN ZUR EVOLUTION DES GONADOTROPEN HORMON-SYSTEMS DER ADENOHYPOPHYSE NIEDERER VERTEBRATEN

von

Syed Ghulam Haider

Ruhr-Universität Bochum

1975

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen
Akademischen Austauschdienstes

UNTERSUCHUNGEN ZUR EVOLUTION DES GONADOTROPEN HORMONSYSTEMS DER ADENOHYPOPHYSE NIEDERER VERTEBRATEN

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

SYED GHULAM H A I D E R
Karachi

B o c h u m 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. V. Blüm
Korreferent: Prof. Dr. R. Reinboth
Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 1975

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. VERSUCHSTIERE UND METHODEN 8

1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen 8
2. Hypophysenfraktionierung 9
3. Referenzstandard 13
4. P^{32}-Bioassay 13
5. Histologische Methoden 14

III. ERGEBNISSE 16

1. Versuchsreihe I 16
   a. Isolierung der Fischhypophysenhormone 17
   b. Bioassay der Fischhypophysenfraktionen ... 18
   c. Vergleichsexperimente mit F-CH 21
   d. Isolierung der Molchhypophysenhormone 21
   e. Bioassay der Molchhypophysenfraktionen ... 24
   f. Isolierung der Froschhypophysenhormone ... 24
   g. Bioassay der Froschhypophysenfraktionen .. 24

2. Versuchsreihe II 28
   a. Isolierung der Fischhypophysenhormone 28
   b. Bioassay der Fischhypophysenfraktionen ... 29
   c. Isolierung der Froschhypophysenhormone ... 34
   d. Bioassay der Froschhypophysenfraktionen .. 34

IV. DISKUSSION 39

1. Besprechung der Ergebnisse 39
   a. Fischgonadotropine 39
   b. Amphibiengonadotropine 42
   c. Allgemeine Bemerkungen zu 1.a. und 1.b. .. 44

2. Zur Evolution des Gonadotropinsystems der niederen Vertebraten 46
   a. Palaeontologische Betrachtungen 46
   b. Funktionelle Divergenzen 47
   c. Ethologische Aspekte 47
   d. Ökologische Anpassung 48
   e. Zoologische Spezifität des Gonadotropinsystems 48
   f. Artspezifität des Gonadotropinsystems 49
   g. Gonadotropin-Thyrotropin-Achse 49
   h. Unität bzw. Dualität des Gonadotropinsystems 50

3. Die "Evolutionstheorie der 5 Phasen" 52

V. ZUSAMMENFASSUNG 58

VI. DANKVERMERKE 60

VII. LITERATURVERZEICHNIS 61

I. EINLEITUNG

In einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten wurde die Abhängigkeit der Gonaden von der Adenohypophyse auch bei Fischen und Amphibien nachgewiesen. Die Kenntnisse über die Hypophysen-Gonaden-Achse bei den höheren Vertebraten haben nicht nur die Art der Untersuchung über ein derartiges System bei den niederen Vertebraten bestimmt, sondern auch die Interpretation der Befunde stark beeinflußt.

Die umfassenden Publikationen von DODD (1964), HOAR (1965), MATTY (1966), VAN OORDT (1968), BARR (1968), LOFTS (1968), HOAR (1969), LILEY (1969), DODD (1972), BURZAWA und FONTAINE (1972), REINBOTH (1972) und DONALDSON (1973) liefern eine Übersicht über die verschiedenen Aspekte der hypophysären Kontrolle der Gonaden bei Fischen. Aufgrund dieser Arbeiten ist anzunehmen, daß ein oder zwei Hormone in spezialisierten Zellen der Adenohypophyse synthetisiert werden und über die Blutbahn direkt auf die Gonaden wirken.

BALL und BAKER (1969), SAGE und BERN (1971), RAI (1972) und SCHREIBMAN, LEATHERLAND u. MCKEOWN (1973) haben die Daten der histologischen und histophysiologischen Untersuchungen über die Struktur der gonadotropen Zellen der Knochenfischhypophyse zusammengefaßt. Hierbei lassen sich zwei unterschiedliche Tendenzen beobachten. Während OLIVEREAU und HERLANT (1960) und KNOWLES und VOLLRATH (1966) bei Aalen (Anguilla anguilla), OLIVEREAU (1962) und LEATHERLAND (1972) beim Goldfisch (Carassius auratus), OLIVEREAU und RIDGEWAY (1962) beim Lachs (Oncorhynchus), ÖZTAN (1966) bei der Aalmutter (Zoarces viviparus), OLIVEREAU (1968) bei der Meerbarbe (Mugil capito) und SIMON (1972) beim Sonnenfisch Lepomis (Centriarchidae) zwei Typen von Gonadotropinzellen identifiziert haben,

konnte beim Kiemensackwels (Heteropneustes fossilis BLOCH) (SUNDARARAJ 1959), bei Poecilia latipinna (BALL und BAKER 1969), beim Lachs Oncorhynchus nerka (MCBRIDE und VAN OVERBEEKE 1969), beim Goldfisch Carassius auratus (YAMAZAKI 1969) und beim mexikanischen blinden Höhlenfisch Anoptichthys jordani (MATTHEIJ 1970) nur ein gonadotroper Zelltyp nachgewiesen werden.

OTSUKA (1956) untersuchte die Wirkung von Lachshypophysen auf die Gonaden juveniler Mäuse und schloß, daß die Knochenfischhypophyse zwei gonadotrope Hormone synthetisiert, die unterschiedliche physiologische Wirkungen zeigen. ROBERTSON und RINFRET (1957) charakterisierten Gonadotropine aus Hypophysen von Oncorhynchus tschwytscha durch Azeton-Eisessig-Fraktionierung und testeten ihre gonadotrope Wirkung anhand der Reifung von Forellenhoden. Diese Methode wurde von SCHMIDT et al. (1965) verbessert. Nur wenige artspezifische Bioassaymethoden haben sich als wirksam, reproduzierbar und statistisch zuverlässig erwiesen. CLEMENS und GRANT (1964) schlugen einen "testicular hydration assay" vor. Sie konnten durch eine Dosis-Antwort-Kurve zeigen, daß Gonadotropine die Flüssigkeitsmenge in Gonaden erhöhen. YAMAZAKI und DONALDSON (1969) konnten die gonadotrope Wirkung durch die Spermiation, d.h. die Spermienfreigabe, bei hypophysektomierten Goldfischen nachweisen. Den Befund, daß die Gonadotropine die Adenylcyclaseaktivität im Ovarienhomogenat von Goldfischen erhöhen, wandten FONTAINE und Mitarbeiter (1970) an, um einen Fischgonadotropin-Bioassay festzulegen. Eine Arbeit von BILLARD, SOLARI und ESCAFFRE (1974) über die quantitative Analyse der Spermiogenese bei Goldfischen lieferte neuerdings eine sehr empfindliche Bioassaymethode für Fischgonadotropin. JALABERT, BRETON und BILLARD (1974) entwickelten einen Bioassay, der auf der in-vitro-Reifung der

Forellenoozyten durch Fischgonadotropin basiert. Außer den oben erwähnten artspezifischen Bioassaymöglichkeiten gibt es in der Literatur zwei Bioassayverfahren, die sich für die Fischgonadotropine als äußerst wirksam erwiesen haben und die für die Charakterisierung dieser Hormone häufig angewandt werden, nämlich den "Froschspermiationsassay" von FONTAINE und CHAUVEL (1961), in dem die Gonadotropine die Freigabe der Spermien bei Rana esculenta initiieren und beschleunigen; und die P^{32}-Bioassaymethode von BRENEMAN, ZELLER u. CREEK (1962), bei der die Gonadotropine die Aufnahme von trägerfreiem P^{32} in den Hoden von Eintagsküken erhöhen. Diese beiden Methoden sind hochempfindlich, statistisch zuverlässig und schnell durchführbar.

Bis heute ist es erst zwei Arbeitsgruppen gelungen, unabhängig voneinander Fischgonadotropine zu isolieren und ein Präparat mit hoher spezifischer Aktivität herzustellen (BURZAWA und FONTAINE 1972, und DONALDSON 1973). BURZAWA-GERARD (1971) und BURZAWA und FONTAINE (1972) benutzten Äthanolfraktionierung, Ionenaustauschchromatographie mit DEAE, Gelfiltration mit Sephadex G50 und G100 und präparative Disk-Elektrophorese, um Gonadotropine aus Karpfenhypophysen (Cyprinus carpio) zu isolieren. Als Bioassay wählten sie den Froschspermiationstest (FONTAINE und CHAUVEL 1961). Ihr Endprodukt, mit einem Molekulargewicht von 27000-35000, zeigte bei der Elektrophorese einen biologisch aktiven Peak bei Rf 0,50 und einen biologisch inaktiven Peak bei Rf 0,80. Das Hormon war zwanzigmal wirksamer als das Ausgangsmaterial (das Azetontrockenpulver der Karpfenhypophysen) und enthielt eine Aktivität, die 1,5xNIH-LH-S1 (Luteinisierungshormon aus Schafshypophysen, vom National Institute of Health, Bethesda, Md., USA) entsprach. DONALDSON und Mitarbeiter (1972) isolierten Gonadotropine aus Onco-

rhynchus tschwytscha durch Äthanolfraktionierung, Gelfiltration mit Sephadex G100 und DEAE,Cellulose-Chromatographie. Die gonadotrope Aktivitat stellten sie durch den Fischspermiationstest (YAMAZAKI und DONALDSON 1968a) und durch den P^{32}-Aufnahmetest (BRENEMAN , ZELLER und CREEK 1962) fest. Ihr Präparat zeigte ein Molekulargewicht von 28500-29400 mit einer Äquivalenz-Aktivität von 3500 IU HCG/mg (menschliches Choriongonadotropin). Nach der Sedimentation bei pH 1,4 trennte sich die gonadotrope Fraktion in zwei Peaks mit Molekulargewichten von je 12800. Diese beiden Reinigungsstudien (BURZAWA und FONTAINE 1972, DONALDSON und Mitarbeiter 1972) weisen darauf hin, daß Karpfen und Lachs nur ein Hormon haben, das allein in der Lage ist, alle physiologischen Vorgänge der Gonaden aufrechtzuhalten.

In einem Übersichtsartikel faßte REINBOTH (1972) die histologischen, experimentell-endokrinologischen und biochemischen Untersuchungen zusammen, mit der Schlußfolgerung, daß die Frage der Unität oder Dualität der Gonadotropine bei Knochenfischen noch nicht endgültig gelöst ist. Seiner Ansicht nach ist dies nicht nur auf methodische Schwierigkeiten, sondern auch auf extreme funktionelle Divergenzen bei Knochenfischen zurückzuführen.

Der Fragenkomplex, wie die Hypophyse auf die Gonaden wirkt, ist bei Amphibien weniger intensiv untersucht worden als bei Knochenfischen.

MATTY (1966), VAN OORDT (1968), RAI (1972) und REDSHAW (1972) haben die histologischen Untersuchungen über die Identifizierung der gonadotropen Zellen bei Amphibien zusammengefaßt. MAZZI et al. (1966) untersuchten sehr eingehend die Gonadotropinzellen bei Molchen (Triturus cristatus carnifex), und aufgrund ihrer histologischen Arbeit und von Kastra-

tionsversuchen stellten sie fest, daß ein "cyanophiler Typ II" Follikel-stimulierende Wirkung hat, und ein "cyanophiler Typ III" luteinisierende Wirkung. KERR (1965) identifizierte diese Typen "II" und "III" als Gonadotropinzellen bei Xenopus, aber er konnte keine funktionelle Trennung zwischen den beiden Zelltypen nachweisen. VAN OORDT (1961, 1963, 1968) hat Gonadotropinzellen bei Rana-Arten sehr intensiv untersucht. Histologisch konnte er "Amphiphile I" und "Amphiphile II" als solche identifizieren. Seine Ergebnisse konnten eine Korrelation zwischen der Gonadenreifung und Veränderungen der pars distalis der Hypophyse bestätigen. Von ihm durchgeführte experimentell-endokrinologische Untersuchungen stützten seine Behauptung, daß der Typ "Amphiphil I" ein Follikel-stimulierendes Hormon, und der Typ "Amphiphil II" ein luteinisierendes Hormon synthetisiert. Histometrische und histochemische Untersuchungen an Rana esculenta führten DE KORT (1971) zu der Hypothese, daß die Hodenfunktion von zwei Gonadotropinen geregelt wird, wobei ein Hormon die Vorgänge der Spermiogenese steuern und das andere das Interstitium stimulieren soll.

Bisher sind nur wenige Möglichkeiten bekannt, einen artspezifischen Bioassay bei Amphibien durchzuführen. THRONTEN (1971) entwickelte eine Bioassaytechnik, die auf in-vitro-Reifeteilung der Oozyten von Xenopus basiert. Diese Methode ist empfindlich und schnell, aber wenig spezifisch. SIMON und REINBOTH (1966) stellten fest, daß Gonadotropine einen Vesikularisierungseffekt in den Hoden von juvenilen Xenopus laevis hervorrufen können, der statistisch sicherbar ist. Wie bereits erwähnt, initiieren die Gonadotropine die Freigabe der Spermien bei Anuren (FONTAINE und CHAUVEL 1961). LICHT (1973) zeigte, daß ein Hypophysenextrakt von Rana catesbeiana die Spermiation bei drei Anurenarten (Rana pipiens, Hyla regilla, Eleutherodactylus coqui) induzierte.

KASINATHAN und BASU (1972) untersuchten histologisch die Wirkung des Rohextraktes der Hypophyse von Rana hexadactyla auf die Spermiogenese derselben Tierart und stellten fest, daß diese Wirkung relativ unabhängig von den Jahreszeiten ist. ORTMAN und Mitarbeiter (1972) analysierten die Verteilung der gonadotropen Aktivität der pars distalis bei Rana pipiens und zeigten, daß die Aktivität in der caudalen Hälfte um den Faktor 1,4 stärker ist als die der rostralen Hälfte. REDSHAW (1972) faßte die Untersuchungen über die Hypophysenwirkung auf das Amphibienovarium zusammen und stellte die Hypothese auf, daß ein einziges Hypophysenhormon sowohl die Vitellogenese als auch die Ovulation herbeiführt. Bisher liegt keine Arbeit über die biochemische Isolierung der Gonadotropine bei Amphibien vor.

Aus dieser kurzen Erläuterung der gegenwärtigen Kenntnisse ist ersichtlich, daß die Frage der evolutionistischen Entwicklung der Gonadotropine bei niederen Vertebraten noch weitgehend ungeklärt ist. Die gängige Auffassung besagt, daß alle drei Glykoproteinhormone (beim Säugetier: Schilddrüsen-stimulierendes Hormon TSH, Follikel-stimulierendes Hormon FSH und luteinisierendes Hormon LH) aus zwei chemischen Untereinheiten bestehen und eine davon, chemich betrachtet, "gemeinsam" ist. Deswegen kann vermutet werden, daß alle drei Glykoproteinhormone der Hypophyse aus einem "Urglykoprotein" entstanden sind. Im Laufe der Hypophysenevolution - vielleicht bei den Cyclostomata - trennte sich das "Urglykoprotein" in zwei Moleküle, ein Schilddrüsen-stimulierendes Hormon und ein Gonaden-stimulierendes Hormon. Die Feststellung von SAGE und BROMAGE (1970), daß TSH und Gonadotropine in der Fischhypophyse bei Poecilia reticulata ihre Zielorgane gegenseitig beeinflussen können, verstärkt diese Vermutung. Daß die Säugetiere und Vögel zwei Hypophysengonadotropine

(FSH und LH) haben, ist heute gesichert (PAPKOFF 1972 und HARTREE und CUNNINGHAM 1969). Bei Reptilien ist die Frage der Unität oder Dualität der Gonadotropine noch nicht endgültig beantwortet (LICHT und PAPKOFF 1974). Die bisher durchgeführten Untersuchungen reichen nicht aus, um eine konkrete Aussage über die Anzahl der Hypophysengonadotropine bei Amphibien machen zu können. Die Arbeiten von BURZAWA und FONTAINE (1972) und DONALDSON (1973) deuten darauf hin, daß die Knochenfischhypophyse nur ein Gonadotropin synthetisiert. Daraus ist zu schließen, daß am Anfang der Hypophysenevolution nur ein Gonadotropin vorhanden war. Im Laufe der Entwicklung wurde an irgendeiner Stelle - höchstwahrscheinlich im Bereich der niederen Vertebraten - das "Urgonadotropin" in zwei Moleküle aufgespalten, die zwar gewisse Ähnlichkeit in der chemischen Zusammensetzung zeigen, aber unterschiedliche biologische Wirkungen in Gonaden hervorrufen.

In der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Klärung dieser Frage geleistet werden. Es soll versucht werden, die Hypophysengonadotropine aus Knochenfischen, Urodelen und Anuren durch die präparative Disk-Elektrophorese zu isolieren und möglichst durch einen artspezifischen Bioassay zu identifizieren. Beim Vorliegen mehrerer gonadotrop aktiver Fraktionen bei einer Art sollen dann eventuelle Unterschiede in der physiologischen Wirkung an Zielorganen charakterisiert werden.

II. VERSUCHSTIERE UND METHODEN

1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

a. Fische: Als Hypophysenspender dienten Goldfische der Art Carassius auratus gibelio BLOCH. Ihr Gewicht betrug 3-5 g und die Länge schwankte zwischen 6 und 10 cm. Die Fische wurden ca. vier Wochen in 40 l-Aquarien bei 25°C mit einer Hell-Dunkelperiode von 12:12 Stunden eingewöhnt. Das Wasser wurde durchgehend belüftet und über ein Saugfilter gereinigt. Die Tiere erhielten täglich 1x lebende Tubifex und Tetramin-Trockenfutter. Die Hypophysenfraktionen wurden in Schwertträgern (Xiphophorus helleri HECKEL) getestet. Sie waren 5-7 cm lang und wogen zwischen 1 und 3 g. Eine Gruppe wurde in derselben Weise akklimatisiert wie die Goldfische, eine zweite wurde nach drei Wochen auf eine veränderte Hell-Dunkelperiode von 5:19 Stunden eingewöhnt. Diese Kurzlichtbehandlung dauerte sieben Wochen und sollte nach HOAR (1962) zu einer "physiologischen Hypophysektomie" führen.

b. Amphibien: Als Vertreter der Urodelen wurde der Kammolch (Triturus cristatus carnifex LAURENTI) gewählt. Die Tiere wurden im Sommer 1972 gefangen. Sie waren 7-10 cm lang und wogen zwischen 2 und 3 g. Der Teichfrosch (Rana esculenta LINNE) wurde als Anurenart eingesetzt. Die Tiere hatten eine Länge von 10-16 cm und ein Körpergewicht von 40-80 g. Sowohl die Molche als auch die Frösche wurden vier Wochen vor den Versuchen in einem Terrarium bei 18°C untergebracht. Die tägliche Beleuchtungsdauer betrug 10 Stunden. Zum biologischen Test wurden selbstgezüchtete juvenile Krallenfrösche (Xenopus laevis DAUDIN) verwendet. Die Versuchstiere waren 69 Tage alt, d.h. 11 Tage nach der Metamorphose (NIEUKOOP u. FABER 1956). Sie wurden in 40 l-Becken bei 25°C gehalten. Die Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden

pro Tag. Sie wurden vor der Metamorphose mit "Mikrozelle" (ein Aufzuchtfutter der Fa. HOBBY) und hinterher mit lebenden Tubifex täglich gefüttert. Die Becken wurden durchgehend belüftet.

c. Eintagsküken: Die zum Bioassay der Froschhypophysenfraktionen notwendigen Eintagsküken wurden von einer Zuchtanstalt kurz vor dem Test gekauft.

2. Hypophysenfraktionierung

Die Goldfische, Kammolche und Frösche wurden in MS 222 (SANDOZ) 1:3000 betäubt und durch Dekapitieren getötet. Die Hypophysen wurden sofort herauspräpariert und unmittelbar danach bei -30°C eingefroren. Die Hypophysenproteine wurden nach einem modifizierten Verfahren von ORNSTEIN (1964) und DAVIS (1964) durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese getrennt. Hierzu wurden selbstgebaute Elektrophoreseapparate aus Plexiglas verwandt (s. Abb. 1). Jedes Röhrchen hatte eine eigene untere und obere Pufferkammer und einen eigenen Kühlmantel. Die Länge des Sammelgels betrug 2,5 cm, die des Trenngels 7 cm; die Gelsäule hatte einen Durchmesser von 5 mm. Es wurde ein 7,5-%iges Gelsystem pH 8,9 mit Tris-Gycin-Puffer pH 8,3 benutzt. Kurz vor der Elektrophorese wurden 10 mg Hypophysen pro Lauf in 0,75 ml Sammelgel homogenisiert (IKA-Rührmotor RM12). Die Laufdauer der Elektrophorese bei konstantem Strom von 5 mA/Röhrchen schwankte zwischen 100 bis 120 Minuten. Die Trennung fand bei pH 9,5 statt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel durch Coomassie-Brillant Blau R 250 gefärbt. (Reihenfolge des Färbungsvorgangs: Fixierung in 12.5-%iger Trichloressigsäure (TCA) - Färbung in 0.05-%iger Coomassie Lösung in 12.5-%iger TCA - Entfärbung in 10-%iger TCA). Nach mehrmaligen Wiederholungen wurde ein Elektrophoretogramm des Hypophysenhomogenats festgelegt (Eppendorf-Photometer

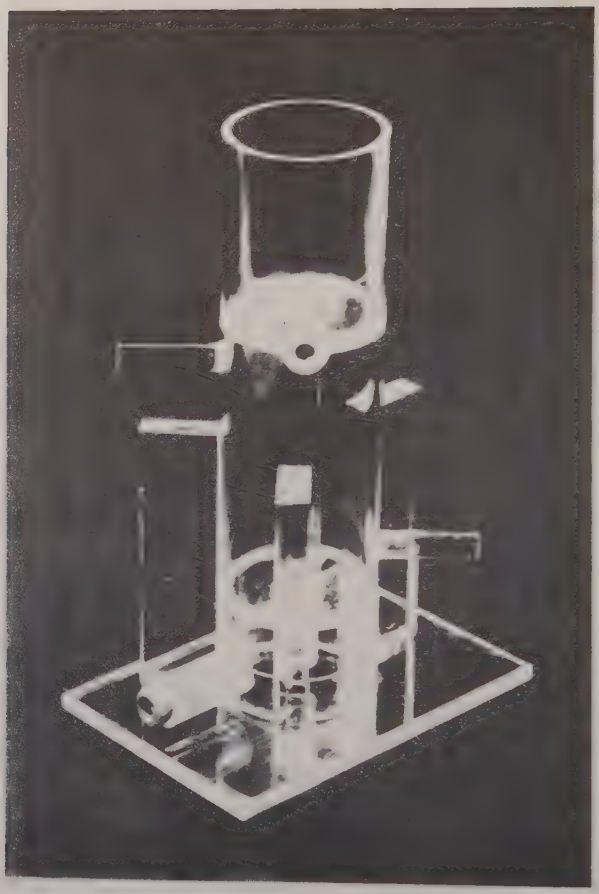
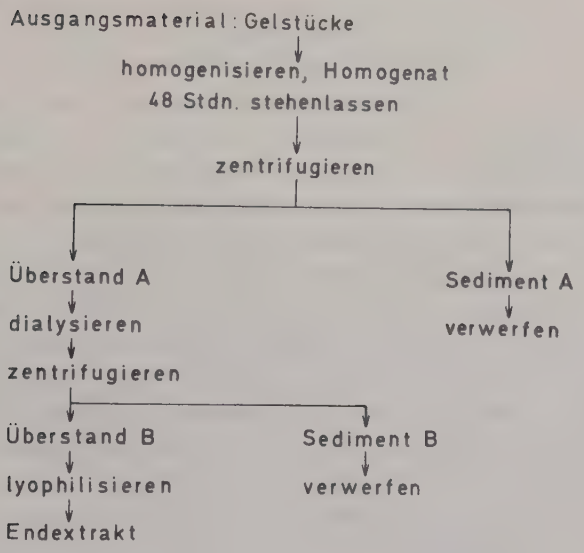


Abb. 1: Der selbstgebaute Elektrophorese-Apparat aus Plexiglas. Jedes Röhrchen hat eine eigene obere und untere Pufferkammer und einen eigenen Kühlmantel.
Oben: Kathode
Unten: Anode

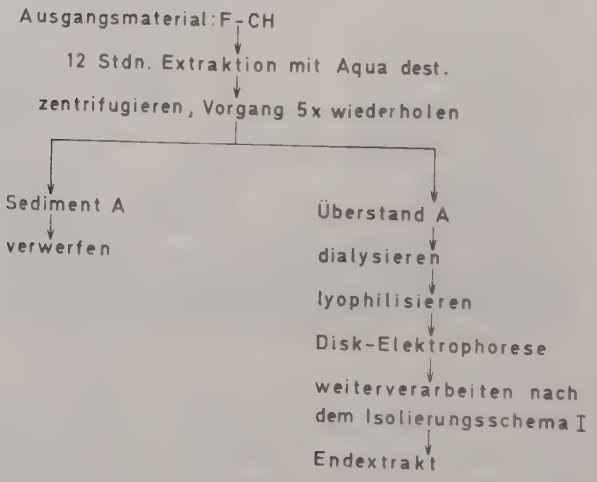
mit Elektrophorese-Scanner, 550 nm). Nach diesem Elektrophoretogramm wurden aus den Gelen im Anschluß an die Elektrophorese - ohne Fixierung und Färbung - die Bezirke der Proteinbanden herausgeschnitten. Sehr nahe beieinander liegende Banden wurden in einer Fraktion gesammelt. Als Kontrolle wurde jeweils eine Gelsäule ohne Probe elektrophoretisiert. Alle Gelfraktionen wurden nach dem folgenden Schema weiterverarbeitet. Die Arbeiten wurden bei 5°C durchgeführt.

Isolierungsschema I



Nach dem o.a. Verfahren wurden insgesamt Hypophysen von 600 Goldfischen, 800 Molchen und 600 Fröschen verarbeitet. Außerdem wurden zum Vergleich 100 mg Azetontrockenpulver (FONTAINE) aus Karpfenhypophysen (Cyprinus carpio) nach dem folgenden Schema bei 5°C fraktioniert (dieses Material wird als "F-CH" bezeichnet.

Isolierungsschema II



3. Referenzstandard: Als Referenzstandard diente ein hochgereinigtes Luteinisierungshormon aus Schafhypophysen (NIH-LH-S13) des National Institute of Health, Bethesda, Md., USA. 1 mg dieses Präparates hat eine spezifische Aktivität von 0,93 USP-E.

4. P^{32}-Bioassay: Die gonadotrope Wirkung der Hypophysenfraktionen wurde durch eine modifizierte Methode der P^{32}-Aufnahme in Hoden (BRENEMAN, ZELLER u. CREEK 1962) untersucht. Bei der Prüfung des Referenzstandards waren jeweils 10 bis 12 Tiere von der Art Xiphophorus helleri in einer Versuchsgruppe. Den Kontrolltieren wurde eine Kontrollösung injiziert, die in der 2. beschriebenen Weise hergestellt wurde. Sechs Stunden danach wurde 2 µCi P^{32} (trägerfrei in verdünnter Salzsäure, mit einer spezifischen Aktivität von 50-140 Ci/mg P, AMERSHAM, England) pro Fisch in beiden Versuchsgruppen injiziert. P^{32} wurde mit physiologischer Kochsalzlösung zum erwünschten Volumen verdünnt. Alle Injektionen wurden intraperitoneal mit einem maximalen Volumen von 0,05 ml/Fisch durchgeführt. 24 Stunden nach der ersten Injektion wurden die Versuchstiere in Ms 222 (SANDOZ) 1:3000 getötet und beide Hoden sofort herauspräpariert. Sie wurden in Fischringerlösung kurz gespült, auf Filterpapier abgetrocknet und sofort auf einer analytischen Waage gewogen. Dann folgte die langsame und vorsichtige Homogenisierung (IKA-Rührmotor RM12) der Hoden in 0,75 ml Insta-Gel (PACKARD INSTRUMENT CO., Inc., USA). Das Homogenat wurde in einer Zählflasche in 9,25 ml Insta-Gel gelöst. Die Aktivität wurde von einem Flüssigkeitsszintillationszähler (PACKARD Tri-Carb, Modell 3375) 10 Minuten lang gemessen. Die Fischhypophysenfraktionen und E-CH-Fraktionen wurden in gleicher Weise an Xiphophorus helleri getestet. Für die Hypophysenfraktionen aus Molchen und Fröschen wurde das

gleiche Verfahren mit folgenden Änderungen angewandt: Die Molchhypophysenfraktionen wurden bei derselben Tierart getestet; sie erhielten 2,5 µCi P^{32} pro Tier. Die Froschhypophysenfraktionen wurden an Eintagsküken getestet, wobei 3 µCi P^{32} pro Tier subcutan in die dorsale Seite des Halses eingespritzt wurden. Sämtliche Injektionsvolumen betrugen 0,1 ml.

Bei der Auswertung wurden die Messungen mit über 4-%iger Standardabweichung nicht berücksichtigt. Die P^{32}-Aufnahme in Hoden wurde nach der Korrektur für die Backgroundaktivität und für den Zerfall während der Meßpause in Counts pro Minute pro mg Naßgewebe (CPM/mg) ausgedrückt. Es wurden auch die prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme und die Äquivalenz-Aktivität der gonadotropen Hypophysenfraktionen in µg NIH-LH-S13 berechnet.

5. Histologische Methoden

a. Fische: Die Wirkung der Fischhypophysenfraktionen wurde in Hoden von Schwertträgern untersucht, die durch eine siebenwöchige Kurzlichtbehandlung "physiologisch" hypophysektomiert wurden (HOAR 1962, siehe auch 1.a.). 10 Tiere wurden pro Versuchsgruppe verwandt. Jeder Fisch erhielt die Hypophysenfraktionen in physiologischer Kochsalzlösung dreimal in wöchentlichen Zeitabständen. Die Injektionen wurden mit einem konstanten Volumen von 0,05 ml intraperitoneal durchgeführt. Die Kontrolltiere wurden mit einer Kontrollösung gespritzt (siehe 2.). Vier Wochen nach der ersten Injektion wurden die Fische durch MS 222, 1:3000 getötet und beide Hoden sofort in BOUIN'scher Lösung fixiert. Danach wurden sie in Paraplast (SHANDON) eingebettet und sagittal 7 µ dick geschnitten. Anschließend erfolgte die Färbung nach der Trichrom-Methode von GOLDNER, kombiniert mit vorheriger Aldehydfuchsin-Behandlung (GOMORI). Die

Aktivität wurde durch direkte mikroskopische Beobachtungen nach drei Parametern ausgewertet:
1. Hodenaktivität (das Vorkommen von Spermatogenese), 2. Interstitium, 3. Spermiation.

b. Amphibien: Nach der Methode von SIMON und REINBOTH (1966) wurde die gonadotrope Wirkung der Froschhypophysenfraktionen in juvenilen Hoden von Xenopus laevis DAUDIN untersucht. 20 Krallenfrösche bildeten eine Versuchsgruppe. Die Hypophysenfraktionen in physiologischer Kochsalzlösung wurden nur einmal subcutan in den dorsalen Lymphsack injiziert (0,1 ml/Tier). Die Kontrolltiere erhielten die Kontrolllösung (siehe 2.). 48 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere in MS 222, 1:3000 getötet und das Urogenitalsystem in BOUIN'scher Lösung fixiert. Bei Versuchstieren, die keine deutlich entwickelten Hoden zeigten, wurde der ganze Abdominalbereich fixiert. Danach folgte die Einbettung in Paraplast (SHANDON). Es wurde sagittal 7 µ dick geschnitten und anschließend mit Aldehydfuchsin-GOLDNER gefärbt. Die Schnitte wurden auf den "Vesikularisierungseffekt" hin, d.h. nach der Aufblähung der Tubuli, ausgewertet.

c. Statistische Methoden: Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach den folgenden Methoden:
i) t-Test nach STUDENT; die Berechnung wurde über Magnetkarten mittels eines OLIVETTI-Mikrocomputer Programma 101 durchgeführt.
ii) Vierfelder-(χ^2)-Test.

III. ERGEBNISSE

Die Experimente können in zwei große Versuchsreihen eingeordnet werden. Bei der Versuchsreihe I wurden die Hypophysen durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese fraktioniert und ihre gonadotrope Wirkung durch die P^{32}-Aufnahmemethode (BRENEMAN, ZELLER u. CREEK 1962) getestet. Bei der Versuchsreihe II wurden die Hypophysen in gleicher Weise fraktioniert wie bei der Versuchsreihe I, aber ihre gonadotrope Wirkung wurde nach histologischen Parametern an Hoden untersucht.

1. Versuchsreihe I:

Es war das Ziel dieser Untersuchungen, die gonadotropen Fraktionen aus Hypophysen von Carassius auratus gibelio, Triturus cristatus carnifex und Rana esculenta zu isolieren und zu identifizieren:

Hypophysenspender	Zahl d. Tiere	Naßgewicht d. Hypophysen (mg)	Zahl d. Gelsäulen	Zahl d. isolierten Fraktionen
Carassius auratus gibelio BLOCH	200	91.4	9	7
Triturus cristatus carnifex LAURENTI	800	46.2	5	4
Rana esculenta LINNE	200	551.0	55	5

Tabelle I: Daten über die Trennung der Hypophysenfraktionen durch Disk-Elektrophorese zur Durchführung der Versuchsreihe I.
(s. auch Abb. 3, 7 u. 9)

1.a. Isolierung der Fischhypophysenhormone:
Es wurden insgesamt 200 Goldfischhypophysen mit einem Naßgewicht von 91.4 mg durch die Disk-Elektrophorese fraktioniert (s. Tabelle I). Das Elektrophoretogramm des Hypophysenhomogenats (s. Abb. 2 u. 3) zeigte 9 Eiweißbanden.

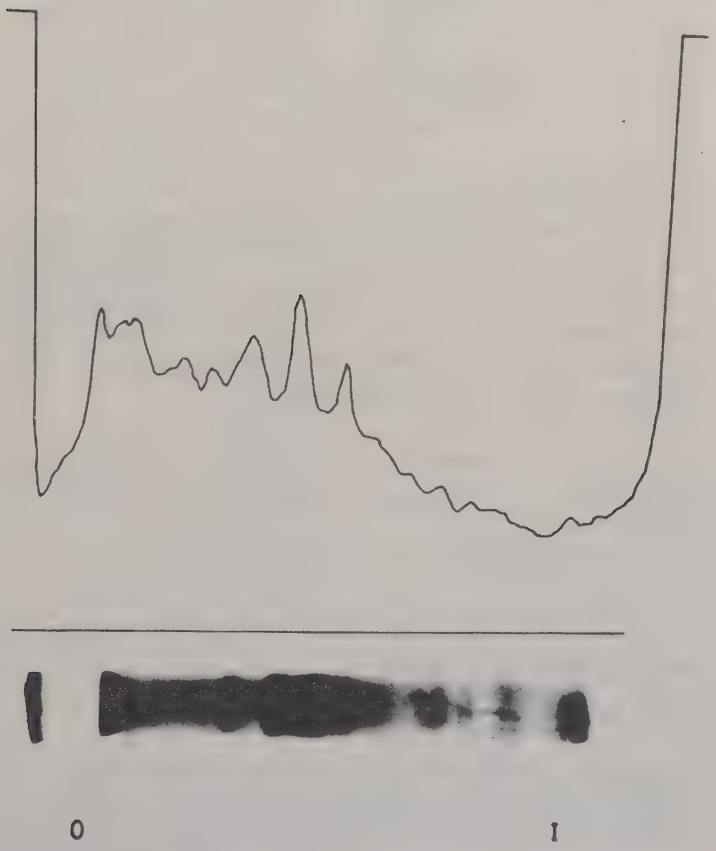


Abb. 2: Die Trennung des Fischhypophysenhomogenats durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese mit Tris-Glycin-Puffer pH 8.3. Das Densitogramm wurde mit einem Eppendorf-Photometer mit Elektrophorese-Scanner bei 550 nm erstellt.
O = Anfang ("Origin"), I = Ende ("Ion Front")
Rechts: Kathode - Links: Anode

Die ersten 5 Banden waren klar und deutlich, die letzten 4 Banden waren schwach. Die 9 Banden wurden in sieben verschiedene Fraktionen eingeteilt, d.h. die Banden Nr. 6, 7 und 8 wurden in einer Fraktion isoliert, weil sie sehr nahe beieinander lagen.

1.b. Bioassay der Fischhypophysenfraktionen:

Beim P^{32}-Up-take-Test zeigten nur die Fraktionen I und IV eine Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Hoden von Xiphophorus helleri. Fraktion I entsprach der Bande Nr. 1 des Elektrophoretogramms mit einem Rf-Wert von 0.15. Diese Fraktion erzielte eine 282-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme. Diese Aktivität entsprach einer Äquivalenz-Aktivität von 78 µg des Referenzstandardpräparates vom Luteinisierungshormon aus Schafhypophysen, NIH-LH-S13. Die zweite aktive Fraktion, d.h. Nr. IV, entsprach der Bande Nr. 4 des Elektrophoretogramms mit einem Rf-Wert 0.49 (s. Tabelle II). Bei dieser Fraktion trat eine 194-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme auf.

Gonadotrope Fraktionen	Fisch	Molch	Frosch
Fraktion I	0.15	0.08	0.1
Fraktion IV	0.49	-	0.63

Tabelle II: Rf-Werte der Hypophysenfraktionen, die beim P^{32}-Bioassay n. BRENEMAN, ZELLER u. CREEK (1962) eine gonadotrope Wirkung zeigten (s. Abb. 3, 7 u. 9).

Dies entsprach einer Äquivalenz-Aktivität von 52.2 µg NIH-LH-S13. Die anderen Fraktionen brachten im Test lediglich kleine (- nicht signifikante -) Erhöhung der P^{32}-Aufnahme (s. Abb. 3). Infolgedessen wurden

BIOASSAY DER FISCHHYPOPHYSENFRAKTIONEN

Bande Nr.	Elektro-phoretogramm	Fraktion Nr.	P^{32} Uptake 1) (CPM / mg Testis)	% Erhöhung P^{32} Uptake
1	(-)	1	650	282
		2	203	19
2				
3		3	197	15
4		4	500	194
5		5	234	37
6				
7		6	187	10
8				
9	(+)	7	202	18
	→ Kontrolle 2)		170	-
	NIH-LH-S 13 3)		669	293

1) Jeder Wert zeigt den Durchschnitt von 8+-1 Tieren. P^{32} Dosis: 2µCi / Fisch
2) PAG-Extrakt, erhalten nach dem selben Verfahren wie die Hypophysenfraktionen
3) 5µg/g Körpergewicht
Punktierte Banden zeigen die schwächeren Banden an.

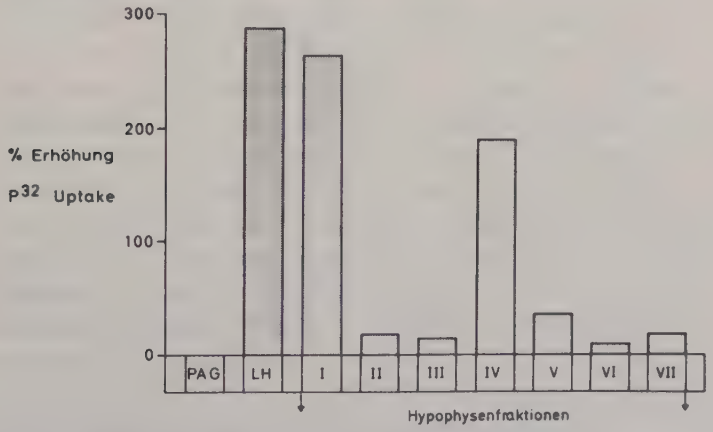


Abb. 3: Oben: Der P^{32}-Aufnahmetest der Goldfisch-hypophysenfraktionen in den Hoden von Schwertträgern Xiphophorus helleri HECKEL.
Unten: Die prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Hoden.
Abszisse: Testsubstanzen
PAG: Polyacrylamidgel, LH: NIH-LH-S13
I bis VII: Goldfischhypophysenfraktionen (s. oben)
Ordinate: Prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Hoden.

die Fraktionen Nr. I und IV als die "gonadotropen Fraktionen" der Fischhypophysen identifiziert.

Der Referenzstandard NIH-LH-S13 erwies sich nach der Disk-Elektrophorese als ein homogenes Präparat, dessen Elektrophoretogramm nur eine einzige Bande mit Rf-Wert 0.14 zeigte (Abb. 4).

Abb. 4: Das Elektrophoretogramm des Luteinisierungshormons aus Schafhypophysen (NIH-LH-S13). Die Trennung erfolgte durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese mit Tris-Glycin-Puffer pH 8.3.
Oben: Kathode - Unten: Anode (weitere Angaben s. Abb. 2)

Berücksichtigt man an dieser Stelle den Rf-Wert 0,15 der ersten gonadotropen Fraktion der Fischhypophysen, d.h. Nr. I, so könnte eine chemische Ähnlichkeit zwischen ihnen vermutet werden. NIH-LH-S13 erzielte bei einer Dosis von 5 µg/g Körpergewicht eine 293-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Schwertträgerhoden (Abb. 3).

1.c. Vergleichsexperimente mit F-CH:

Die o.a. Ergebnisse über die Goldfischhypophysenfraktionen lieferten eine Ausgangsbasis, um eine Vergleichsuntersuchung mit Azetontrockenpulver von Karpfenhypophysen (F-CH, Prof. FONTAINE, s.S. 12) durchzuführen. Ziel dieser Experimente war zu testen, ob das F-CH auch ähnliche gonadotrope Fraktionen enthält wie die Goldfischhypophyse. Hierbei sollten nur diejenigen Gelfraktionen isoliert werden, die Fraktion I und Fraktion IV der Goldfischhypophysen in 1.b. entsprachen. F-CH wurde nach dem Isolierungsschema II (s. Seite 12) verarbeitet. Nach der Disk-Elektrophorese wurden die zwei Gelstücke ausgeschnitten, die den Goldfischhypophysenfraktionen I (Rf-Wert 0.15) und IV (Rf-Wert 0.49) entsprachen und weiter extrahiert. Es wurden 4.3 mg Fraktion I und 2.3 mg Fraktion IV als Endausbeute gewonnen. Die Fraktion IV induzierte eine 125-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Schwertträgerhoden, die Fraktion I dagegen nur eine 11-%ige (- nicht signifikante -) Erhöhung (s. Abb, 5).

1.d. Isolierung der Molchhypophysenhormone:

Um die Urodelenhypophysen zu untersuchen, wurden insgesamt 800 Kammolche verwendet. Das Naßgewicht der Hypophysen betrug 46,2 mg. Sie wurden durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese fraktioniert. Das Elektrophoretogramm zeigte insgesamt 8 Banden (s. Abb. 6 u. 7). Alle Banden waren deutlich, die Bande Nr. 6 war schwach. Die Banden Nr. 2, 3, und 5

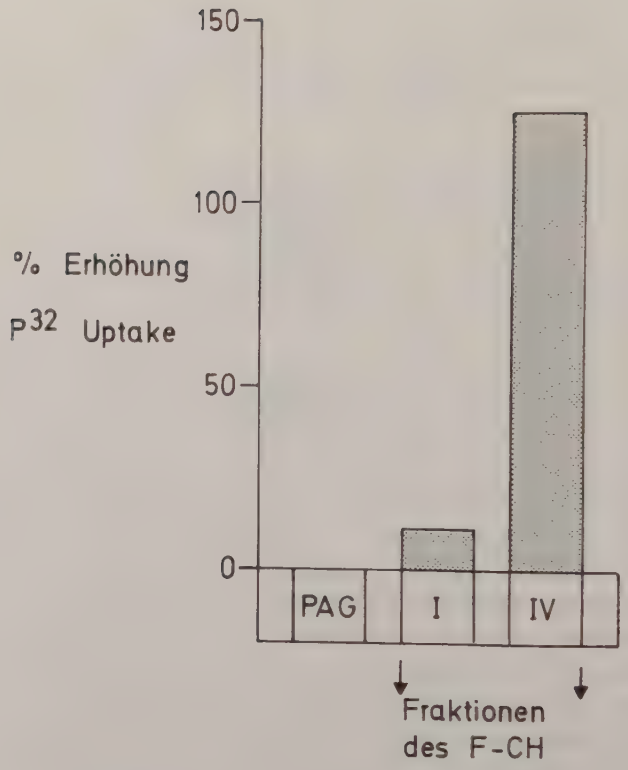


Abb. 5: Der P^{32}-Aufnahmetest der Karpfenhypophysenfraktionen F-CH in Schwertträgerhoden.
Abszisse: Testsubstanzen
PAG: Polyacrylamidgel, I und IV: Gelfraktionen nach der Disk-Elektrophorese von F-CH. Fraktion I entspricht dem Rf-Wert 0.15 und Fraktion IV dem Rf-Wert 0.49.
Ordinate: Prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Hoden.

lagen dicht beieinander. Zur Extraktion wurden die Banden Nr. 1 in Fraktion I, Nr. 2, 3, 4 und 5 in Fraktion II, Nr. 6 in Fraktion III und Nr. 8 in Fraktion IV zusammengefaßt.

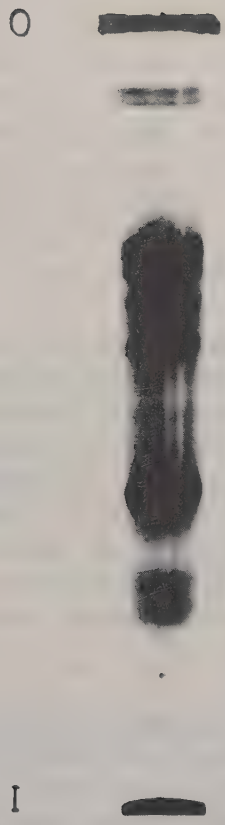


Abb. 6: Das Elektrophoretogramm des Molchhypophysenhomogenats. Die Trennung erfolgte durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese mit Tris-Glycin-Puffer pH 8.3.
Oben: Kathode - Unten: Anode
(weitere Angaben s. Abb. 2)

1.e. Bioassay der Molchhypophysenfraktionen:
Beim P^{32}-Bioassay konnte nur die Fraktion I eine Erhöhung der P^{32}-Aufnahme induzieren (s. Abb.7). Die prozentuale Erhöhung betrug 196 % und entsprach einer Äquivalenz-Aktivität von 152 µg NIH-LH-S13. Diese "gonadotrope" Fraktion entsprach der Bande Nr. 1 des Elektrophoretogramms, die einen Rf-Wert von 0.08 hatte (s. Tabelle II). Das Standardpräparat NIH-LH-S13 (Rf-Wert: 0.14) induzierte bei einer Dosis von 5 µg/g Körpergewicht eine 130-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Kammolchen.

1.f. Isolierung der Froschhypophysenhormone:
Die Anurenhypophysen aus insgesamt 200 Teichfröschen wurden in gleicher Weise verarbeitet. Die Froschhypophysen hatten ein Naßgewicht von 551,0 mg. Bei der Elektrophorese trennten sich die Hypophysenproteine in 7 Banden (s. Abb. 8 u. 9). Alle Banden außer Nr. 4 waren scharf und deutlich. Während die Banden 4, 5 und 6 zusammen in einer Fraktion isoliert wurden, wurden die anderen Banden einzeln den Fraktionen zugeordnet.

1.g. Bioassay der Froschhypophysenfraktionen:
Es wurde ursprünglich konzipiert, diese Fraktionen nach der P^{32}-Aufnahme-Methode in den Hoden von Rana esculenta zu testen. Nach mehrmaligen Versuchen mit NIH-LH-S13 zeigte sich, daß der P^{32}-Bioassay bei den Froschhoden nicht durchgeführt werden kann. Die Ergebnisse waren uneinheitlich und nicht reproduzierbar. Die intensive Pigmentierung und der hohe Lipidgehalt des Froschhodens verursachten einen "Quench-Effekt" (eine Störung bei der Umsetzung der Strahlenenergie in Lichtenergie, auch Löscheffekt genannt, RUGE u. KACZMARCZYK 1967), der die Messung der P^{32}-Aktivität erheblich beeinträchtigte (sehr niedrige automatische externe Standardisierung A. E. S.: 0.3 bis 0.4). Es wurde versucht, die starke Pigmen-

BIOASSAY DER SALAMANDERHYPOPHYSENFRAKTIONEN

Bande Nr.	Elektro-phoretogramm	Fraktion Nr.	P^{32} Uptake 1) (CPM / mg Testis)	% Erhöhung P^{32} Uptake
1	(-)	1	1083	196
2 3 4 5		2	323	–
6 7		3	308	–
8	(+)	4	381	4
	→ Kontrolle 2)		365	–
	NIH-LH-S13 3)		840	130

1) Jeder Wert zeigt den Durchschnitt von 8±1 Tieren. P^{32} Dosis: 2,5 µCi/Salamander
2 PAG-Extrakt, erhalten nach dem selben Verfahren wie die Hypophysenfraktionen
3) 5µg/g Körpergewicht
Punktierte Banden zeigen die schwächeren Banden an.

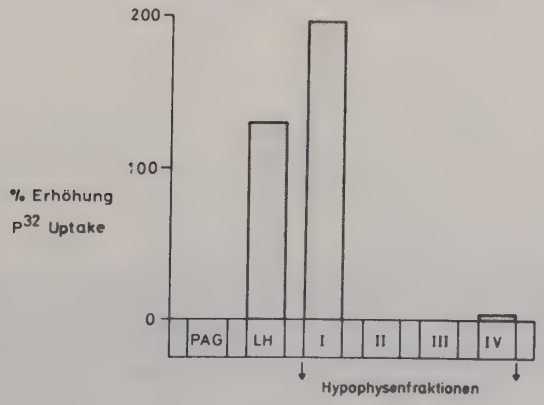


Abb. 7: Oben: Der P^{32}-Aufnahmetest der Molchhypophysenfraktionen in den Hoden der gleichen Tierart.
Unten: Die prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Hoden.
Abszisse: Testsubstanzen
PAG: Polyacrylamidgel, LH: NIH-LH-S13
I bis IV: Molchhypophysenfraktionen (s. oben)
Ordinate: Prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Hoden.

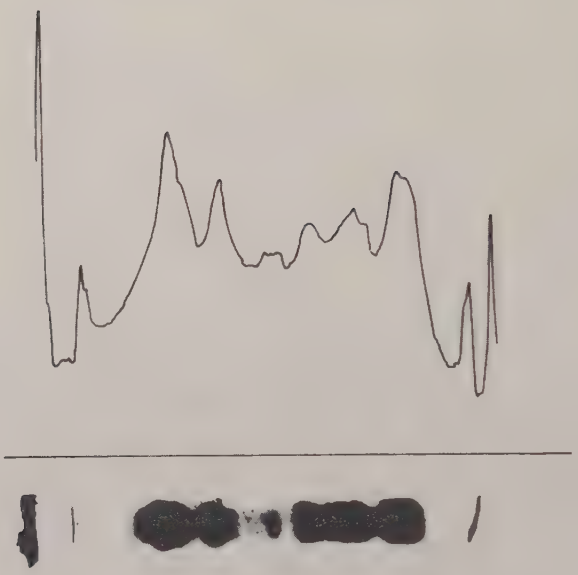


Abb. 8: Die Trennung des Froschhypophysenhomogenats durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese mit Tris-Glycin-Puffer pH 8.3. Das Densitogramm wurde durch Eppendorf-Photometer mit Elektrophorese-Scanner bei 550 nm erhalten (weitere Angaben s. Abb. 2).

tierung mit 30-%igem Perhydrol zu entfernen; dies konnte jedoch die Meßschwierigkeiten nicht beseitigen. Aus diesem Grunde wurden die Hypophysenfraktionen vom Frosch an Eintagsküken getestet. Dies entspricht der Standardmethode von BRENEMAN, ZELLER u. CREEK (1962) für höhere Wirbeltiere. Die Fraktion Nr. I und die Fraktion Nr. IV zeigten eine Erhöhung

BIOASSAY DER FROSCHHYPOPHYSENFRAKTIONEN

Bande Nr.	Elektro-phoretogramm	Fraktion Nr.	P^{32} Uptake [1] (CPM/mg Testis)	% Erhöhung P^{32} Uptake
1	(-)	1	265	46
2		2	170	–
3		3	165	–
4 5 6		4	238	31
7	(+)	5	168	–
	→ Kontrolle [2]		181	–
	NIH-LH-S13 [3]		336	85

1) Jeder Wert zeigt den Durchschnitt von 8±1 Tieren. P^{32} Dosis: 3 µCi/Eintagsküken
2) PAG-Extrakt, erhalten nach dem selben Verfahren wie die Hypophysenfraktionen
3) 5 µg/g Körpergewicht
Punktierte Banden zeigen die schwächeren Banden an.

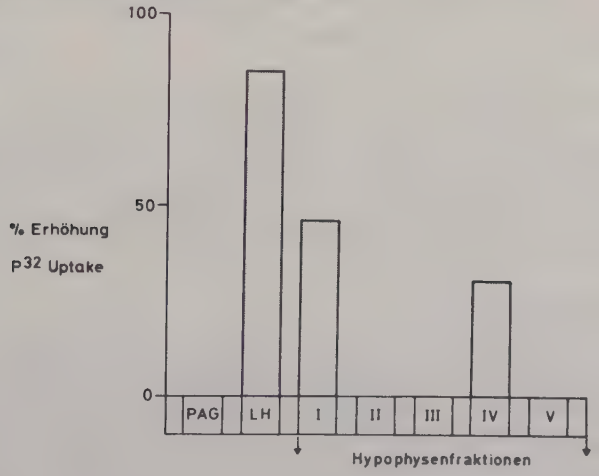


Abb. 9: Oben: Der P^{32}-Aufnahmetest der Froschhypophysenfraktionen in den Hoden von Eintagsküken.
Unten: Die prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Hoden.
Abszisse: Testsubstanzen
PAG: Polyacrylamidgel, LH: NIH-LH-S13
I bis V: Froschhypophysenfraktionen
Ordinate: Prozentuale Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Hoden.

der P^{32}-Aufnahme in den Eintagsküken (s. Abb. 9). Die Fraktion Nr. I erzielte eine signifikante 46-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme. Dies entsprach einer Äquivalenz-Aktivität von 644 µg NIH-LH-S13. Diese Fraktion Nr. I entsprach der Bande Nr. 1 mit einem Rf-Wert 0.1 (Tabelle II). Bei der zweiten aktiven Fraktion, d.h. der Fraktion Nr. IV, wurde eine 31-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme registriert, die Wirkung entsprach einer Äquivalenz-Aktivität von 455 µg NIH-LH-S13. Die Fraktion IV entsprach den Banden Nr. 4,5 und 6 des Elektrophoretogramms. Die drei Banden hatten einen durchschnittlichen Rf-Wert von 0.63 (Rf-Bereich: 0.53-0.73). In dieser Weise konnten die Fraktionen Nr. I und IV der Froschhypophysen als "gonadotrope Fraktionen" identifiziert werden. NIH-LH-S13 erzielte mit einer Dosis von 5 µg/g Körpergewicht eine 85-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in den Eintagsküken-hoden.

Somit konnten nach Abschluß der Versuchsreihe I zwei gonadotrope Fraktionen in der Goldfischhypophyse, eine gonadotrope Fraktion in der Kammolchhypophyse und zwei gonadotrope Fraktionen in der Teichfroschhypophyse nachgewiesen werden.

2. Versuchsreihe II:

Da die Versuchsreihe I im Gegensatz zur gängigen Meinung den Befund erbrachte, daß Knochenfische und Anuren zwei gonadotrop aktive Fraktionen in der Hypophyse besitzen, stellte sich die Frage nach den Eigenschaften dieser Hormone, d.h.: Lassen sich die zwei gonadotropen Fraktionen beim Goldfisch und beim Teichfrosch funktionell unterscheiden?

2.a. Isolierung der Fischhypophysenhormone:

Es wurden Hypophysen von 400 Goldfischen verwandt. Ihr Naßgewicht war 196 mg. Hierbei sollten nur die Hypophysenfraktionen isoliert werden, die sich bei

der Versuchsreihe I (s. 1.b.) als gonadotrope Fraktionen erwiesen haben. Nach der Elektrophorese wurden die zwei Gelstücke ausgeschnitten und weiter nach dem Isolierungsschema I (s. S. 11)verarbeitet, die bei der Versuchsreihe I die Fraktion I (bzw. die Bande 1 mit Rf-Wert 0.15) und die Fraktion IV (bzw. die Bande 4 mit Rf-Wert 0.49) besaßen. Die Ausbeute war 5.2 mg Fraktion I und 6.42 mg Fraktion IV (s. Tabelle III).

Hypophysenspender	Zahl d. Tiere	Naßgewicht d. Hypophysen (mg)	Zahl d. Gelsäulen	Nr. der 1) isolierten Fraktionen
Carassius auratus gibelio BLOCH	400	196	20	I u. IV
Rana esculenta LINNE	400	937	94	I u. IV

Tabelle III: Daten über die Trennung der Hypophysenfraktionen durch Disk-Elektrophorese zur Durchführung der Versuchsreihe II.
1) Die Nummern beziehen sich auf die Hypophysenfraktionen bei der Versuchsreihe I. (s. auch Abb. 3 u. 9).

2.b. Bioassay der Fischhypophysenfraktionen:

Der Einfluß dieser beiden Fraktionen (s. 2.a.) auf Schwertträgerhoden wurde histologisch untersucht (s. S.11). Die drei Auswertungsparameter der histologischen Beobachtungen waren: a) Hodenaktivität (das Vorkommen von Spermiogenese, Mitosen etc.), b) Interstitium, c) Spermiation (Freisetzung der Spermien). Die Intensität des Vorkommens eines Parameters wurde in 6 Intensitätsgraden (IG) erfaßt (von IG 0 bis IG 5). Zur Prüfung der Signifikanz der

Ergebnisse wurde der t-Test nach STUDENT herangezogen.

Das histologische Bild der Kontrolltiere (s. Abb. 10a) zeigte funktionsfähige Hoden. Es wurden zwar Spermatogonien, primäre und sekundäre Spermatozyten, Spermatiden, aber wenige fertige Spermien beobachtet: Es zeigte sich das deutliche Bild eines schwach aktiven Hodens. Der durchschnittliche IG der Hodenaktivität lag bei 2.5. Das Interstitium (d.h. die Leydig-Zellen) waren ebenfalls schwach entwickelt und von kollagenem Bindegewebe durchwachsen (durchschnittlicher IG: 2). In keinem Fall wurde Spermiation beobachtet.

Die Versuchstiere, die mit der Hypophysenfraktion I (F-I) behandelt worden waren, zeigten das histologische Bild hochaktiver Hoden (s. Abb. 10b). Der durchschnittliche IG der Hodenaktivität betrug 4.5 ($p < 0.001$ gegen Kontrollen). Es waren alle Stadien der Spermiogenese vorhanden; hypertrophierte Hoden-Tubuli kamen häufig vor. Das Interstitium war sehr gut entwickelt, der durchschnittliche IG war 4 ($p < 0.01$ gegen Kontrollen). In jedem Tier konnten eindeutig Spermiationen beobachtet werden; dieser Effekt ist statistisch hoch gesichert ($p < 0.001$ gegen Kontrollen).

Bei den Versuchstieren, die mit Hypophysenfraktion IV (F-IV) behandelt worden waren, war das histologische Bild der Hoden durch folgende Merkmale charakterisiert (s. Abb. 10c): Die Hoden waren hoch aktiv mit einem durchschnittlichen IG von 4.5 ($p < 0.001$ gegen Kontrollen): der Unterschied gegen F-I-Wirkung war statistisch nicht signifikant. Es waren alle Phasen der Spermiogenese zu beobachten. Das Interstitium war schwächer entwickelt als das der mit F-I behandelten Tiere. Es zeigte wie die Kontrollen einen durchschnittlichen IG von 2.

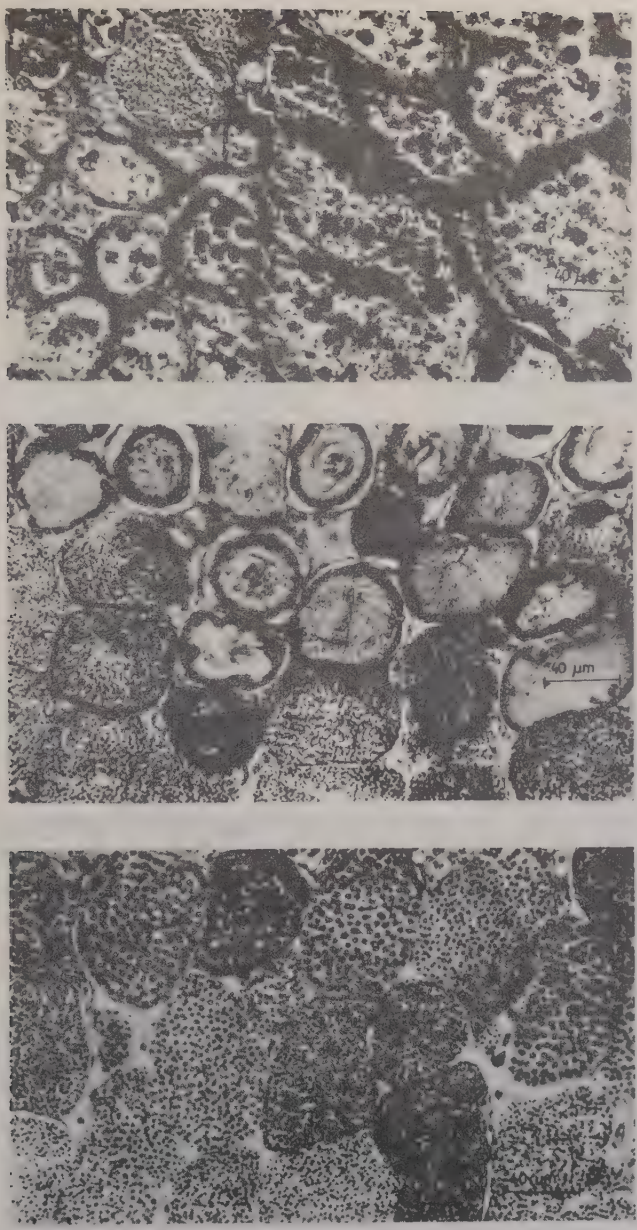


Abb. 10 (a, b, c): Mikroaufnahmen von Querschnitten der Hoden von Xiphophorus helleri HECKEL; Schnittdicke: 7 µ; Färbung: Aldehydfuchsin-GOLDNER
a) Hoden eines Kontrolltieres
b) Hoden eines mit Fischhypophysenfraktion I behandelten Tieres
c) Hoden eines mit Fischhypophysenfraktion IV behandelten Tieres

Dieser Effekt ist jedoch gegen die F-I-Wirkung gut gesichert ($p < 0.01$). Spermiation war mit einem durchschnittlichen IG von 0.5 nur selten zu beobachten. Der Unterschied gegen die Kontrollen erwies sich als nicht signifikant, gegen die F-I-Wirkung war dieser Parameter jedoch statistisch hoch gesichert ($p < 0.001$).

Versuchsgruppe → / Parameter ↓	Kontrollgruppe	Gruppe f. Fraktion I (F-I)	Gruppe f. Fraktion IV (F-IV)
Hodenaktivität	2.5	4.5 a)	4.5 b), c)
Interstitium	2	4 d)	2 e), f)
Spermiation	0.0	4 g)	0.5 h), i)

Tabelle IV: Die Wirkung der Goldfischhypophysenfraktionen auf Schwertträgerhoden: Histologische Beobachtungen.
Die Werte zeigen den durchschnittlichen Intensitätsgrad (Erklärung im Text, s. auch Abb. 11)
a) $p < 0.001$ gegen Kontrollen
b) $p < 0.001$ gegen Kontrollen
c) Der Unterschied gegen F-I-Wirkung ist nicht signifikant
d) $p < 0.01$ gegen Kontrollen
e) Der Unterschied gegen Kontrollen ist nicht signifikant
f) $p < 0.01$ gegen F-I-Wirkung
g) $p < 0.001$ gegen Kontrollen
h) Der Unterschied gegen Kontrollen ist nicht signifikant
i) $p < 0.001$ gegen F-I-Wirkung
p wurde durch den t-Test nach STUDENT berechnet.

Alle histologischen Auswertungen dieses Experimentes sind in der Tabelle IV und in der Abb. 13 dokumentiert.

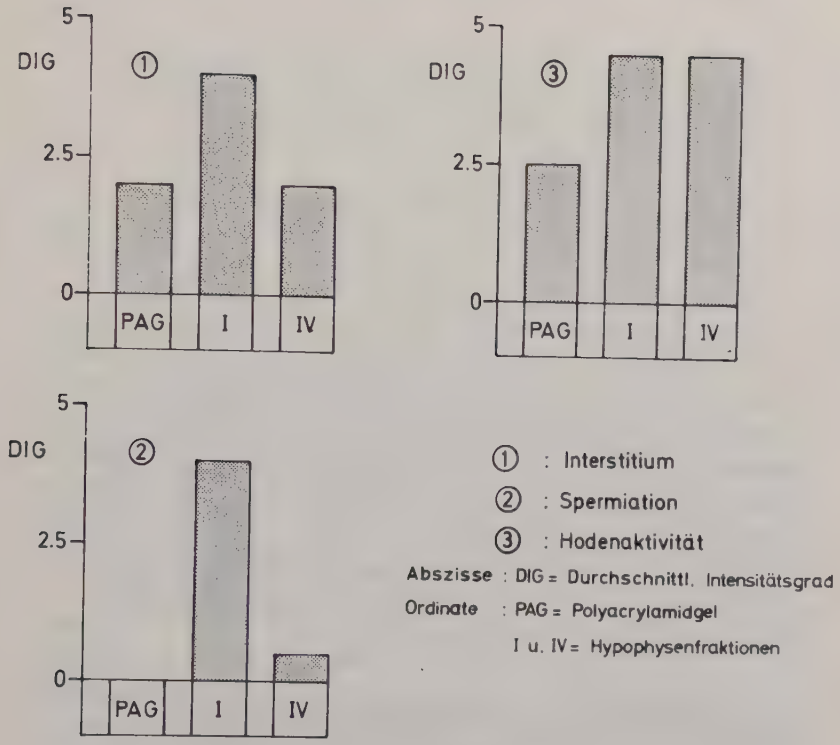


Abb. 11: Histophysiologische Wirkungen der Fischhypophysenfraktionen I und IV auf den Schwertträgerhoden.

Zusammenfassend können aus diesen Beobachtungen folgende Schlüsse gezogen werden:

a) Fraktion I ist in der Lage, allgemein den Hoden zu aktivieren, d.h. sie induziert Spermiogenese, Spermiation und aktiviert das Interstitium.

b) Fraktion IV ruft ebenfalls eine verstärkte Spermiogenese hervor, kann aber weder das Interstitium noch die Spermiation stimulieren.

Somit kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine funktionelle Trennung der beiden Hormonfraktionen im Organismus geschlossen werden.

2.c. Isolierung der Froschhypophysenhormone:
Es wurden Hypophysen aus 400 Teichfröschen mit einem Naßgewicht von 937 mg verwendet. Hierbei sollten - wie bei den Goldfischen - nur die Hypophysenfraktionen isoliert werden, die bei der Versuchsreihe I (s. 1.f.) eine gonadotrope Wirkung gezeigt haben. Nach der Disk-Elektrophorese wurden die zwei entsprechenden Gelstücke ausgeschnitten und weiterverarbeitet (die in der Versuchsreihe I, Froschhypophasenfraktion I, bzw. Bande 1 mit einem Rf-Wert von 0.1 und Froschhypophysenfraktion IV, bzw. Banden 4, 5 und 6 mit einem durchschnittlichen Rf-Wert von 0.63) (s. Abb. 9). Die Endausbeute betrug 25,09 mg Fraktion I und 21,02 mg Fraktion IV.

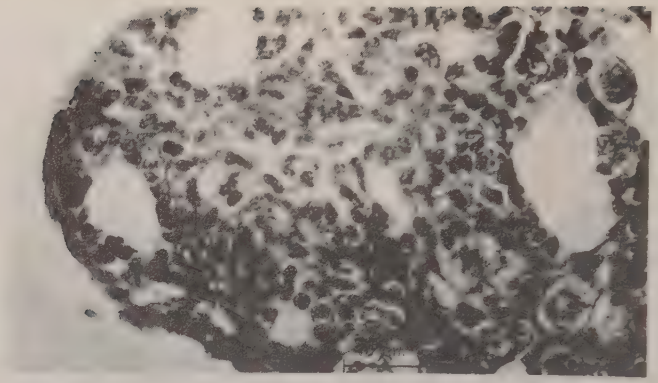
2.d. Bioassay der Froschhypophysenfraktion:
Die Wirkung der beiden Fraktionen wurde nach der Methode von SIMON u. REINBOTH (1966) in juvenilen Hoden von Xenopus laevis DAUDIN histologisch untersucht (s. S.15). Als Parameter diente der sogenannte "Vesikularisierungseffekt", d.h. die Aufblähung der Hoden-Tubuli. Um die Intensität des Effektes zu beschreiben, definierten SIMON u. REINBOTH (1966) die Wirkungsgrade 1, 2 und 3. Im vorliegenden Fall entsprach der Zustand der Hoden der Kontrolltiere dem Wirkungsgrad 1 von SIMON und REINBOTH (1966). Aus diesem Grunde wurde die Hormonwirkung in eigene drei Grade klassifiziert, die ungefähr eine Stufe weiter als die von SIMON und REINBOTH vorgeschlagene

Aufteilung der Wirkungsgrade liegen. Zur statistischen Sicherung der Beobachtungen wurde der Vierfelder-(χ^2)-Test angewandt.

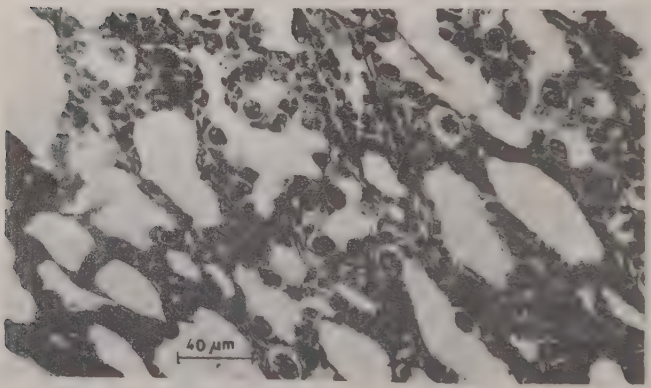
Die Hodenschnitte von 7 Kontrolltieren zeigten (s. Abb. 12a) einige kleine Hohlräume; dieses Bild entspricht im vorliegenden Experiment dem Wirkungsgrad 0. Ein ähnliches Bild zeigten 3 von 12 Tieren der Fraktion I-Gruppe (F-I), die anderen 9 dagegen zeigten (s. Abb. 12b) einen intensivierten Vesikularisierungseffekt; die Hohlräume waren größer als die der Kontrollhoden und besaßen fast eine so große Fläche wie das somatische und generative Hodengewebe. Dieser Effekt wurde als Wirkungsgrad 1 bezeichnet ($p < 0.02$ gegen die Kontrollen). Das histologische Hodenbild der Versuchstiere, die mit Hypophysenfraktion IV (F-IV) behandelt worden waren, zeigte folgende Merkmale (Abb. 12c): Die Wände der Hoden-Tubuli waren häufig dünn, die Hohlräume nahmen fast die ganze Fläche ein; es wurden wenig Keimzellen beobachtet. Diese Wirkung war im Vergleich zur F-I-Wirkung so stark ausgeprägt, daß alle F-IV-Tiere in Wirkungsgrad 3 eingestuft werden konnten. Dieses Ergebnis ist gegen die Kontrollen ($p < 0.002$) und gegen die F-I-Wirkung ($p < 0.002$) statistisch signifikant.

Die Ergebnisse von diesen Bioassay sind in Tabelle V und in der Abb. 13 zusammengefaßt. Sie lassen eindeutig erkennen:

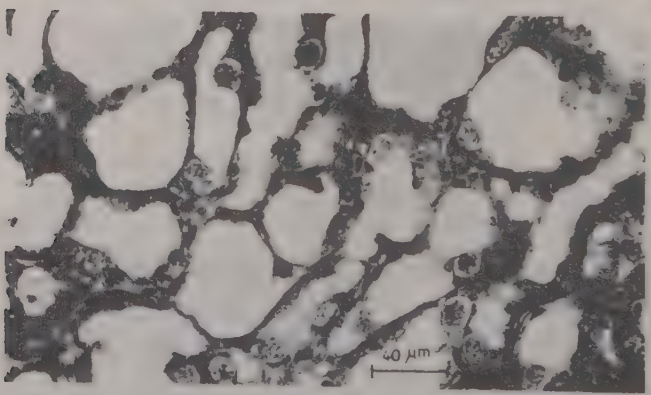
a) Beide Froschhypophysenfraktionen können einen Vesikularisierungseffekt erzielen. Dadurch ist ihre gonadotrope Wirkung nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse der Versuchsreihe I.
b) Die Wirkungen der beiden gonadotropen Fraktionen unterscheiden sich quantitativ. Fraktion IV hat bezüglich des Vesikularisierungseffektes etwa die 3-fache Potenz der Fraktion I.



a



b



c

Abb. 12 (a, b, c): Vesikularisierungsbioassay nach SIMON und REINBOTH (1966). Mikroaufnahmen der juvenilen Hoden von Xenopus laevis DAUDIN.
Schnittdicke: 7 µ; Färbung: Aldehydfuchsin-GOLDNER
a) Hoden eines Kontrolltieres
b) Hoden nach der Behandlung mit Froschhypophysenfraktion I; das Bild zeigt den Vesikularisierungsgrad 1.
c) Hoden nach der Behandlung mit Froschhypophysenfraktion IV; das Bild zeigt den Vesikularisierungsgrad 3.

Versuchs-gruppe	Zahl d. Tiere	männl.	Zahl d. Tiere mit Wirkungsgrad 0	1	2	3	% positiv
Kontrolle	20	7	7	-	-	-	-
Fraktion I (F-I) a)	20	12	3	9	-	-	75
Fraktion IV (F-IV) b), c)	20	10	-	-	-	10	100

Tabelle V: Vesikularisierungseffekt der Froschhypophysenfraktionen in juvenilen Hoden von Xenopus laevis DAUDIN (nach SIMON u. REINBOTH 1966) (s. auch Abb. 13)
a) $p < 0.02$ gegen Kontrollen
b) $p < 0.002$ gegen Kontrollen
c) $p < 0.002$ gegen F-I Wirkung

p wurde durch den Vierfelder-(χ^2)-Test berechnet.

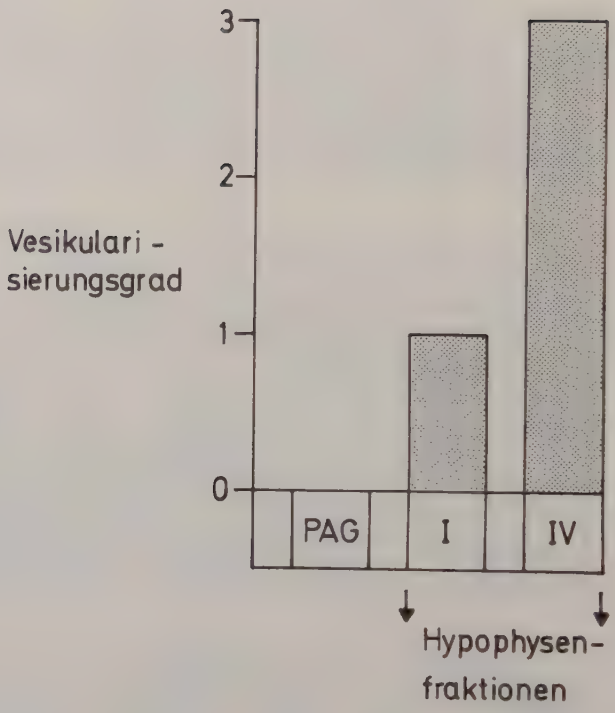


Abb. 13: Eine graphische Darstellung des Vesikularisierungseffektes der Froschhypophysenfraktionen I und IV in juvenilen Hoden von Xenopus laevis DAUDIN.
Abszisse: Testsubstanzen
PAG: Polyacrylamidgel
I und IV: Froschhypophysenfraktionen
Ordinate: Intensität der Vesikularisierung
in den Hoden von Xenopus laevis DAUDIN

IV. DISKUSSION

1. Besprechung der Ergebnisse

a. Fischgonadotropine: Die vorliegenden Befunde des P^{32}-Bioassay und der histologischen Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Fischhypophyse zwei Gonadotropine enthält. Fraktion I erzielte eine 282-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Schwertträgerhoden. Diese Fraktion hatte einen Rf-Wert von 0.15 und war dem Rf-Wert nach NIH-LH-S13 (0.14) analog; dies läßt ähnliche physikochemische Eigenschaften der beiden Hormone vermuten. Die Fraktion I induzierte Spermiogenese und Spermiation und aktivierte das Interstitium. LH (Luteinisierungshormon) hat bei höheren Vertebraten ähnliche Funktionen, d.h. Freisetzung der Spermien und Aktivierung des Interstitiums (TURNER u. BAGNARA 1971). Daher kann man die Fraktion I als "LH-ähnliches Fischgonadotropin" bezeichnen.
Die zweite gonadotrope Fraktion der Goldfischhypophysen (Nr. IV) erzielte eine 194-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme. Diese Fraktion zeigte einen Rf-Wert 0.49. BURZAWA (1971) isolierte ein gonadotropes Hormon aus den Karpfenhypophysen; dieses Hormon zeigte - bei ähnlicher elektrophoretischer Trennung - einen Rf-Wert von 0.5. Man kann daher vermuten, daß es sich um ein und dasselbe Hormon handelt. Bei den Vergleichsexperimenten mit Karpfenhypophysen (F-CH) hat sich nur eine Fraktion (Rf-Wert 0.49) als gonadotrop aktiv erwiesen. Der Befund stimmt mit den Ergebnissen von BURZAWA (1971) überein. Betrachtet man die extreme funktionelle Divergenz bei den Knochenfischen (- mit mehr als 20.000 Arten die größte Wirbeltiergruppe, REINBOTH, 1972 -), so kann bei ihnen das Vorkommen unterschiedlicher endokrinologischer Modelle nicht ausgeschlossen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei Karpfen- und Goldfischen können aber auch auf die verschiedenen Trennmethoden zurückgeführt werden.

Die zweite aktive Fraktion der Goldfischhypophysen (d.h. Nr. IV) regulierte die Spermiogenese in Schwertträgerhoden, war aber nicht in der Lage, Spermiation zu induzieren und das Interstitium zu aktivieren. Diese Wirkung - eine gametogene - ähnelt der Wirkung des FSH bei den höheren Vertebraten (TURNER u. BAGNARA 1971). Wie bereits erwähnt, zeigten diese Fraktion und das Hormonpräparat von BURZAWA (1971) einen ähnlichen Rf-Wert. Neuerdings ist es BURZAWA (1974) gelungen, dieses Hormon in zwei Untereinheiten zu trennen und dann zu rekombinieren ("reassoziieren"). Diese Ergebnisse lassen eine biochemische Ähnlichkeit zwischen Säuger-FSH und Karpfengonadotropin vermuten. Die Fraktion IV der Goldfischhypophysen ist daher wahrscheinlich ein "FSH-ähnliches Fischgonadotropin".

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, besitzen die Goldfische also zwei Gonadotropine. Diese Dualität wurde auch von HATTING u. TOIT (1973) beim Schlammfisch Labeo umbratus, SMITH beobachtet. Sie isolierten die Hypophysenfraktionen durch Disk-Elektrophorese, DEAE-Zellulose und Sephadex G-50 und testeten die gonadotrope Wirkung durch den Fischspermationsassay (YAMAZAKI u. DONALDSON 1969). Sie konnten zwei gonadotrope Fraktionen mit Rf-Werten von 0.24 und 0.37 nachweisen. HYDER (1970 u. 1972) studierte eingehend die endokrine Regulation der Fortpflanzung bei Tilapia-Arten. Seine histologischen, histochemischen und pharmakologischen Untersuchungen deuten darauf hin, daß bei Tilapia ein FSH-ähnliches Hormon die Spermiogenese initiiert und aufrechterhält und ein LH-ähnliches Hormon die Spermiation induziert und das Interstitium aufbaut. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen seine Vermutung. Die histologischen und experimentell-endokrinologischen Beobachtungen über die Ultrastruktur der Pars distalis von Sonnenbarschhypophysen (Lepomis macrochirus) führten SIMON (1972) zur Schlußfolgerung, daß β-Zellen ein FSH-ähnliches Hormon und die γ-Zellen

ein LH-ähnliches Hormon synthetisieren.

Die o.a. Ergebnisse widersprechen den Reinigungsstudien von BURZAWA u. FONTAINE (1972), DONALDSON u. Mitarbeiter (1972), und SUNDARARAJ, ANAND u. SINHA (1972) (s. Kapitel I). BURZAWA (1971) und BURZAWA u. FONTAINE (1972) berichteten über die Isolierung und Reinigung eines einzigen gonadotropen Hormons aus Karpfenhypophysen (Cyprinus carpio). Dieses Hormon erhöhte die Hydration der Fischhoden, P^{32}-Aufnahme in Aalenhoden (BURZAWA u. FONTAIN 1965) und Adenylcyclase-Aktivität in Goldfischovarien (FONTAINE u. Mitarbeiter 1970). Außerdem induzierte dieses Präparat Spermiogenese und Spermiation bei hypophysektomierten Goldfischen (BILLARD u. Mitarbeiter 1970). DONALDSON u. Mitarbeiter (1972) erhielten ein hochgereinigtes Gonadotropinpräparat aus Lachshypophysen (Oncorhynchus tshawytscha), das Hormon induzierte Spermiogenese, Spermiation, Vitellogenese und Ovulation in hypophysektomierten Goldfischen (YAMAZAKI u. DONALDSON 1968a, 1968b) und in hypophysektomierten Kiemensackwelsen (SUNDARARAJ u. Mitarbeiter 1971, SUNDARARAJ u. ANAND 1972). SUNDARARAJ, ANAND u. SINHA (1972) fraktionierten die Hypophysen aus drei Karpfenarten (Puntius gonionotus, Ctenopharyngoden idellus und Aristichys nobilis) durch Gelfilteration mit Sephadex G-100. Sie erhielten drei Fraktionen (I, II und III), deren gonadotrope Aktivität an Ovarien der Fischart Heteropneustes fossilis getestet wurde. Die Fraktion II induzierte Oogenese, Vitellogenese und Ovulation und erhielt die Eientwicklung aufrecht. Fraktionen I und III zeigten keine Wirkung. Diese Autoren schlossen daraufhin, daß die Karpfenhypophysen nur ein Gonadotropin enthalten. Daß die Hypophyseneiweiße sich in drei Fraktionen trennten, schließt die Möglichkeit nicht aus, daß die Fraktion II mehr als ein Protein enthält. Diese Autoren haben die chemische Homogenität der Fraktion II nicht getestet.

Die o.a. Befunde von BURZAWA (1971), DONALDSON u. Mitarbeiter (1972) und SUNDARARAJ, ANAND u. SINHA (1972) sprechen für eine Unität des Gonadotropinsystems bei Knochenfischen. Daraufhin stellten BURZAWA u. FONTAINE (1972) die Hypothese auf, daß die Fischhypophyse nur ein Gonadotropin synthetisiert und die Fischgonaden zwei Rezeptoren bilden: Einen für die gametogene Wirkung und den anderen für die steroidogene Wirkung des Gonadotropins. Akzeptiert man die Hypothese als allgemein gültig, so können nicht nur die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sondern auch das von vielen Autoren berichtete Vorkommen von zwei Gonadotropinzelltypen bei Knochenfischen (s. 2.h. dieses Kapitels) nicht erklärt werden.

b. Amphibiengonadotropine: Durch den P^{32}-Bioassay konnte nur ein Gonadotropin in Molchhypophysen identifiziert werden. Dieses Gonadotropin hatte einen Rf-Wert von 0.08 und induzierte eine 196-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme an Molchhoden. Die Gonadotropine der Molchhypophysen sind bisher nur sehr wenig untersucht worden. MAZZI et al. (1966) identifizierten zwei Gonadotropinzelltypen in der Hypophyse von Triturus cristatus carnifex. Hierbei konnte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die Molchhypophyse tatsächlich zwei Gonadotropine synthetisiert und eines der beiden Hormone aus evolutionistischen Gründen nicht in der Lage ist, seine Wirkung zu entfalten (s. 3. dieses Kapitels). Während bei Molchen in der vorliegenden Arbeit ein Gonadotropin identifiziert wurde, enthielten die Froschhypophysen zwei Gonadotropine. Wenn man nun diese unterschiedlichen Befunde innerhalb der Amphibien aus palaeontologischer Sicht betrachtet, kann eine Arbeit von JARVIK (1965) einen wichtigen Hinweis liefern. Er ist der Ansicht, daß die Evolution von den Fischen zu den Amphibien sich in zwei unterschiedlichen Bahnen vollzogen hat: Die porolepiformen Fische führten zu den Urodelen und die osteolepiformen

Fische zu den Anuren. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Entwicklungsbahnen kann man vermuten, daß sich auch die Hypophyse beim Molch anders entwickelt haben könnte als beim Frosch.

Nach P^{32}-Methode konnten in der Froschhypophyse zwei gonadotrop aktive Fraktionen nachgewiesen werden. Daß die Froschgonadotropine an Eintagsküken positiv reagierten, beweist, daß die Gonadotropinrezeptoren des Vogelhodens die Moleküle der Fischgonadotropine binden können. Fraktion I, mit einem Rf-Wert 0.1, induzierte eine 46-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme. Fraktion IV, mit einem durchschnittlichen Rf-Wert von 0.63, zeigte eine 31-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme. Insofern besaß die Fraktion I eine höhere Aktivität als die Fraktion IV. Die Fraktion IV vertrat drei Proteinbanden (Nr. 4, 5 und 6 mit Rf-Werten von 0.53 bis 0.73). Die Fraktion IV war also eine heterogene Fraktion. Beim Test des Vesikularisierungseffektes (nach SIMON u. REINBOTH 1966) haben sich die beiden Fraktionen (I. und IV.) als aktiv erwiesen. Es konnte außerdem ein quantitativer Unterschied der Wirkung festgestellt werden; Fraktion IV war um den Faktor 3 wirksamer als die Fraktion I. Über die Ursache der Vesikularisierung der juvenilen Hoden von Xenopus laevis ist sehr wenig bekannt. Einen analogen Effekt haben CLEMENS u. GRANT (1964) bei Knochenfischen berichtet: Die Gonadotropine erhöhten den Wassergehalt der Hoden. Man kann vermuten, daß beim Vesikularisierungseffekt die "Hydratisierungswirkung"der Gonadotropine eine wichtige Rolle spielt.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine Dualität der Gonadotropine bei Anurenarten. Die Arbeiten von KERR (1965), VAN OORDT (1961, 1963, 1968), DE KORT (1971) und KASINATHAN u. BASU (1972) (s. Kapitel I) unterstützen diese Feststellung. Eine endgültige Antwort über die Zahl der Gonadotropine bei Amphibien

kann erst nach der biochemischen Charakterisierung der Hormone geliefert werden.

c. Allgemeine Bemerkungen zu 1.a. und 1.b.: Vergleicht man die Rf-Werte der gonadotropen Fraktionen aus Fisch-, Molch- und Froschhypophysen (s. Tabelle II), so kann man die allgemeine Tendenz feststellen, daß die Fraktionen I und Fraktionen IV bei diesen Tierarten jeweils in ähnlichen Mobilitätsbereichen liegen (Fraktion I beim Fisch: 0.15, beim Molch: 0.08 und beim Frosch: 0.10; Fraktion IV beim Fisch: 0.49 und beim Frosch: 0.53-0.73). Aus diesem Vergleich kann auf einen ähnlichen physikochemischen Charakter der Gonadotropinmoleküle bei den niederen Vertebraten geschlossen werden.

Die Frage, wie P^{32} in Hodenzellen eingebaut wird, ist weitgehend ungeklärt. WIEBE (1972) untersuchte den Wirkungsmechanismus der Gonadotropine bei Hoden niederer Vertebraten. Er stellte fest, daß die Gonadotropine die Aktivität des steroidogenen Enzyms Δ^5-3ß-hydroxysteroid Dehydrogenase (3ß-HSD) erhöhten; diese Erhöhung war ein Folgeakt einer erhöhten Eiweißsynthese, vermutlich über einen "second messenger" (cyclisches AMP). Aufgrund der Ergebnisse schloß er, daß die gonadotrope Regulation der Aktivität der Steroiddehydrogenase im mitochondrialen "Genom" stattfindet. Der Adenylcyclase-Bioassay der Fischgonadotropine von FONTAINE u. Mitarbeitern (1970, s. Kapitel I) und die o.a. Wirkungsmechanismusexperimente von WIEBE (1972) führen zur Vermutung, daß das P^{32} vom "cyclischen-AMP-System" im Hodenmitochondrion "verwertet" wird.

Die histologischen Untersuchungen über die Goldfischhypophysenfraktionen und der Vesikularisierungsbioassay der Froschhypophysenfraktionen stimmen insofern überein, daß die Fraktion IV, sowohl vom Fisch als

auch vom Frosch, den Aufbau der Zellen initiierte und die Proliferation der Hodengewebe beschleunigte - eine gametogene Wirkung. Bei Säugetieren übernimmt FSH sämtliche gametogene Aufgaben (TURNER u. BAGNARA 1971). Es ist also durchaus möglich, daß es sich bei Fraktion IV der Fisch- und Froschhypophysen um ein FSH-ähnliches Gonadotropin handelt.

Die Gonadotropine der niederen Vertebraten sind - chemisch betrachtet - Glykoproteine (BURZAWA u. FONTAINE 1972). An Polypeptidkette, dem "Rückgrat" des Moleküls, werden Oligosaccharidseitenketten durch O-glykosidische und N-glykosidische Bindungen "befestigt" (KARLSON 1970). Lösen sich diese Bindungen, so trennen sich Eiweißteil (Aglykon) und Kohlenhydratteil (Glykon). Eine Aufspaltung des Glykoproteinmoleküls in Glykon und Aglykon (z.B. nach Perjodsäure-Behandlung) führt zum vollkommenen Verlust der biologischen Aktivität des Hormons (GESCHWIND u. LI 1958). Es ist nicht unmöglich, daß die Fisch- und Froschgonadotropine in dieser Weise während der Disk-Elektrophorese oder wegen einer enzymatischen Abbaureaktion aufgespalten wurden. Aus den Ergebnissen des P^{32}-Bioassay ist jedoch zu ersehen, daß diese Möglichkeit bei den Fraktionen I und IV der Fisch- und Froschhypophysen nicht zutrifft. Beide Fraktionen haben eine signifikante gonadotrope Wirkung. Die Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Hoden ist eine spezifische gonadotrope Wirkung (BRENEMAN 1973). Daß die Thyrotropine mit hoher Dosis auch ähnliche Effekte erzielen können (BRENEMAN 1973), ist auf die ähnliche chemische Struktur der TSH, FSH und LH zurückzuführen (PAPKOFF 1972). Außer mit Hypophysenglykoproteinen (TSH, FSH und LH) ist diese Wirkung mit keinem anderen Hypophysenmolekül nachgewiesen worden. Ein gutes Argument dafür, daß die Fraktionen I und IV tatsächlich vollständige Glykoproteinmoleküle enthalten, liefern die histologischen Untersuchungen. Beide Fraktionen aus Fisch- und Froschhypophysen haben eine signifikante biologische Wirkung ge-

zeigt. Angesichts dieser Überlegung und der vorliegenden histologischen Ergebnisse kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß es sich bei Fraktionen I und IV um Glykoprotein und Aglykon handelt.

Viele Autoren weisen auf eine gewisse "Interaktion" zwischen den gonadotropen und den schilddrüsestimulierenden Wirkungen hin (FONTAINE 1969, SAGE u. BROMAGE 1970). In Anbetracht der ähnlichen chemischen Konfiguration der drei Glykoproteine (TSH, FSH u. LH) ist dies verständlich. Es ist wohl möglich, daß bei der gonadotropen Wirkung der aktiven Fraktionen von Fischen (I und IV), Molchen (I) und Fröschen (I und IV) das TSH der Spenderhypophysen eine gewisse Rolle gespielt hat. Dies wird in Punkt 2.g. dieses Kapitels eingehend besprochen.

2. Zur Evolution des Gonadotropinsystems bei niederen Vertebraten

Evolution ist ein sehr vielseitiges Phänomen. Um die Entwicklungsgeschichte des Gonadotropinsystems richtig darstellen zu können, sollten nicht nur die chemischen Konfigurationen der gonadotropen Moleküle, sondern auch palaeontologische Betrachtungen, funktionelle Divergenzen, ethologische Aspekte, ökologische Anpassungen und zoophysiologische Zusammehänge (u.a. die zoologische Spezifität und die Artspezifität des Gonadotropinsystems und zwischenhormonale Integration etc.) mit berücksichtigt werden. Die Integration dieser Aspekte ist für das "evolutionistische" Verständnis eines endokrinologischen Systems von essentieller Bedeutung.

a. Palaeontologische Betrachtungen: Die drei Fischklassen (1. Elasmobranchii, Haiartige; 2. Actinopterygii, Strahlenflosser und 3. Crossopterygii, Quastenflosser) haben sich mehr als 500 Millionen Jahre lang unabhängig voneinander entwickelt. Bemerkenswert ist auch die

Feststellung von JARVIK (1965), daß die Tetrapoden nicht aus Actinopterygii (Knochenfischen) entstanden sind, sondern aus Crossopterygii (Quastenflosser).

b. Funktionelle Divergenzen: Berücksichtigt man die o.a. Entwicklungslinien, so ist die extreme funktionelle Divergenz innerhalb der Fische nicht unerklärlich. Allein bei Knochenfischen gibt es mehr als zwanzigtausend Arten. Nicht nur die Zahl der Arten, sondern auch die enorm unterschiedlichen und hochspezialisierten Fortpflanzungsarten sind faszinierend: Oviparie, Ovoviviparie, Viviparie, Hermaphroditen und das Phänomen der Intersexualität. Es ist zu vermuten, daß die unterschiedlichen Fortpflanzungsarten nicht durch identische endokrine Systeme reguliert werden können. BARRINGTONs Ansicht (1968) über die adaptative "diversification" des Hormons und des Zielorgans, zur Evolution der Gonadensteroide der Vertebraten berücksichtigt diese extreme funktionelle Divergenz.

c. Ethologische Aspekte: Die Untersuchungen über die hormonale Steuerung von Verhaltensweisen der Fortpflanzung bei Knochenfischen haben einen wichtigen Beitrag geleistet, um die Evolution der Korrelation zwischen einem Hormon und einer "Motivation" klären zu können (BLÜM und FIEDLER 1965, BAGGERMAN 1968, KRAMER 1971 und FIEDLER 1974). Bei den Teleostei steuern die Gonadotropine und Gonadensteroide das Kampfverhalten, Nestbau und Balzverhalten; die neurohypophysären Hormone induzieren den Laichakt s. str.. Das Prolaktin übernimmt die Brutpflege (BLÜM 1974). Die etho-endokrinologischen Befunde deuten nicht nur auf eine Artspezifität der Hormonwirkung hin, sondern auch auf die Spezifität des Rezeptors im Zielorgan. BLÜM und FIEDLER (1965) zeigten auf anderer Ebene, daß Prolaktin bei dem Cichliden Symphysodon aequifasciata axelrodi Schleimzellenvermehrung und Verdickung der Epidermis hervorruft; ein solcher Effekt konnte bei den nah ver-

wandten Pterophyllum scalare mit gleicher Dosis ebenfalls erzielt werden, die Intensität der Reaktion war jedoch erheblich schwächer. Das zeigt, daß die Zellen im Zielorgan der beiden Cichliden auf dasselbe Hormon quantitativ unterschiedlich reagierten. Solche Untersuchungen mit gonadotropen Hormonen können auch wichtige Hinweise über die zoologische Spezifität des Gonadotropinsystems und eventuell über dessen Evolution liefern.

d. Ökologische Anpassung: Die Osmoregulation von Lampetra ähnelt der von Süßwasserfischen und die von Myxine der der marinen Wirbellosen (MORRIS 1965). Daraus ist ersichtlich, daß das endokrine System während der Evolution bei der Anpassung des Organismus an ökologische Bedingungen eine wichtige Rolle gespielt hat. Wie entscheidend die ökologischen Bedingungen das Gonadotropinsystem der niederen Vertebraten beeinflussen können, zeigen die Untersuchungen von DE KORT (1971). Im Herbst und Anfang Winter hielt er für zwei Monate Frösche bei +24°C und +4°C (Kontrollen). Er stellte fest, daß die erhöhte Temperatur eine Wiederbelebung der Spermiogenese und eine Regression des Interstitiums herbeiführte. Die Temperatur scheint in diesem Fall einen gametogenen (FSH-ähnlichen) Einfluß zu induzieren. Nach einer Diskussionsbemerkung von NICOLL (1972) übernimmt die Temperatur bei Poikilothermen eine gewisse modulierende Rolle im Gonadotropinsystem, die bei Homoiothermen von der Hypophyse getragen wird.

e. Zoologische Spezifität des Gonadotropinsystems: Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, in dem man ein gonadotropes Hormon in einem artfremden Zielorgan getestet hat. Solche "Wechselwirkungsstudien" sind von großer Bedeutung für die zoologische Spezifität der Gonadotropine der Vertebraten, und diese Arbeiten haben erheblich zum Verständnis deren Evolution bei-

getragen. CHANNING u. Mitarbeiter (1974) definierten die zoologische Spezifität als "das Fehlen einer physiologischen Wechselwirkung zwischen heterologen Arten". Eine Reihe von Autoren (FONTAINE 1964, FONTAINE 1969, SUNDARARAJ u. ANAND 1972 und CHANNING u. Mitarbeiter 1974) haben eine "one-way" (einbahnige) zoologische Spezifität der Gonadotropine bei den Vertebraten nachgewiesen, d.h. daß die Säuger-Gonadotropine bei allen Vertebratengruppen eine gonadotrope Wirkung herbeiführen, daß aber die Fischgonadotropine bei Säugetieren inaktiv seien. In der Phylogenese vom Fisch bis zum Säugetier scheinen die Zielorgane eine höhere spezifische Affinität zum endogenen Hormon entwickelt zu haben. Während die Rezeptoren der Fischgonaden in der Lage sind, die Gonadotropine aller Wirbeltiere zu erkennen, haben die Rezeptoren der Säugergonaden diese Fähigkeit weitgehend verloren, d.h. sie sind "zoologisch spezifisch" geworden.

f. Artspezifität des Gonadotropinsystems: Einige Autoren haben über eine Artspezifität der Wirkung der Gonadotropine berichtet (PICKFORD u. ATZ 1957, BARR 1968, LICHT u. PAPKOFF 1972, REINBOTH 1972 und LICHT 1973). LICHT (1973) zeigte, daß Säuger-LH nach Froschspermiationstest in Rana pipiens wirksamer ist als Säuger-FSH, Säuger-FSH ist aber in Hyla regilla und in Eleutherodactylus coqui doppelt so aktiv als Säuger-LH. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auch darauf hin, daß eine phylogenetische Divergenz innerhalb einer Tierklasse größer sein kann als zwischen zwei Tierklassen.

g. Gonadotropin-Thyrotropin-Achse: Ein wichtiges Phänomen ist die gegenseitige Beeinflussung von TSH und Gonadotropinen bzw. Schilddrüsen und Gonaden. Alle drei Hormone (TSH, FSH u. LH) bestehen bei höheren Vertebraten aus zwei Untereinheiten (α u. β). PAPKOFF (1972) stellte die Aminosäuresequenz von Schaf-LH und Rinder-TSH fest; TSH-α und LH-α sind chemisch identisch,

TSH-ß und LH-ß zeigen eine 50-%ige Homologie. Eine biologische Homologie zwischen TSH und Gonadotropinen reflektieren die Untersuchungen von FONTAINE (1969). Er isolierte ein Glykoprotein aus Säuger-Hypophyse und nannte es "Heterothyrotropic Factor (HTF)". HTF hatte keine Wirkung auf die Säugerschilddrüse; HTF, Thyrotropine und Säuger-Gonadotropine erhöhten I^{131}-Aufnahme in die Knochenfischschilddrüse. Er vermutete, daß Säuger-Gonadotropine eine "angeborene"TSH-Wirkung haben. Die Befunde über HTF sind für die Evolution insofern sehr bedeutend, daß ein Hormon beim Tier seiner Herkunft keine Wirkung zeigt, aber in einer phylogenetisch weit entfernten Tiergruppe aktiv ist. BRENEMAN (1973) berichtete: Säuger-LH erhöhte P^{32}-Aufnahme in der Eintagskükenschilddrüse, - eine thyrotrope Wirkung -; Säuger-TSH erhöhte die P^{32}-Aufnahme in Eintagskükenhoden, - eine gonadotrope Wirkung -. SAGE u. BROMAGE (1970) schlugen ein kybernetisches Modell vor, um die "Interaktion" zwischen TSH und Gonadotropinen bei Knochenfischen darzustellen.

h. Unität bzw. Dualität des Gonadotropinsystems:

Aus der Literatur können folgende zwei Hypothesen über die Zahl der Gonadotropinmoleküle bei niederen Vertebraten konkretisiert werden:

a) Unitätstheorie:

Die Hypophyse synthetisiert nur ein Hormon, das allein in der Lage ist, alle physiologischen Vorgänge der Gonaden zu steuern. Diese Unität des Gonadotropinsystems wurde von BURZAWA u. FONTAINE (1972), DONALDSON (1973) und SUNDARARAJ, ANAND u. SINHA (1972) für Knochenfische vorgeschlagen. BURZAWA u. FONTAINE (1972) halten es auch für Amphibien gültig. REDSHAW (1972) schlug die Unität des Gonadotropinsystems für Amphibien vor. BURZAWA u. FONTAINE (1972) bauten diese Hypothese weiter aus und postulierten das Vorkommen von zwei Rezeptoren in den Gonaden: Der eine mit gametogenen Eigen-

schaften und der zweite mit steroidogenen Eigenschaften. Eine präzise hypophysäre Regulierung wird durch spezifische Differenzierungsfähigkeiten der beiden Rezeptoren gewährleistet. NICOLL (1972) erklärte diese Unität in einer anderen Perspektive; er führte in der Diskussion an, daß die Poikilothermen ein Gonadotropin hätten, und die Temperatur eine Differenzierung der gametogenen und steroidogenen Vorgänge verursachte. Nach seiner Ansicht benötigen die Homoiothermen ein zweites Gonadotropin, weil sie den "Vorteil" der Temperaturfluktuation verloren haben. Akzeptiert man diese Hypothese, so kann das Vorkommen von zwei Gonadotropinzelltypen in der Hypophyse der niederen Vertebraten nicht erklärt werden, die von folgenden Autoren gezeigt wurden: Bei Knochenfischen: OLIVEREAU u. HERLANT (1960), OLIVEREAU (1962, 1968), OLIVEREAU u. RIDGEWAY (1962), KNOWLES u. VOLLRATH (1966), ÖZTAN (1966), SIMON (1972) und LEATHERLAND (1972); bei Amphibien: MAZZI et al. (1966), KERR (1965), VAN OORDT (1961, 1963, 1968). Die experimentell-endokrinologischen Arbeiten von HYDER (1972) und HATTING u. TOIT (1972) bei Fischen und von DE KORT (1971) und KASINATHAN u. BASU (1972) bei Amphibien widersprechen der Unitätstheorie. Die vorliegenden Ergebnisse über Fisch- und Froschhypophysen stimmen auch nicht mit dieser Hypothese überein.

b) Dualitätstheorie:

Diese Theorie sieht das Vorkommen von zwei gonadotropen Hormonen bei niederen Vertebraten vor. Ein Hormon hat eine FSH-ähnliche gametogene Wirkung und das zweite eine LH-ähnliche steroidogene Aktivität (VAN OORDT 1968 und HYDER 1972). Folgende Beobachtungen haben zu dieser Theorie geführt: Das Vorkommen von zwei Gonadotropinzelltypen in der Hypophyse, eine differenzierte Stimulierung der gameto-

genen und der steroidogenen Gonadengewebe bei niederen Vertebraten während des Fortpflanzungszyklus und die qualitativ unterschiedliche Wirkung des Säuger-FSH und des Säuger-LH an Gonaden der niederen Vertebraten. Hierbei wird man mit den gleichen Schwierigkeiten konfrontiert wie bei der Unitätstheorie, denn folgende Autoren konnten nur einen einzigen Gonadotropinzelltyp bei Knochenfischhypophysen identifizieren: SUNDARARAJ (1959), BALL u. BAKER (1969), MCBRIDE u. VAN OVERBEEKE (1969), YAMAZAKI (1969)und MATTHEIJ (1970). Die biochemischen Reinigungsstudien über Fischgonadotropine lehnen die Dualitätstheorie ab (BURZAWA 1971 und DONALDSON u. Mitarbeiter 1972). Die Ergebnisse bezüglich der Molchhypophysen der vorliegenden Arbeit widersprechen ebenfalls dieser Dualitätstheorie.

3. Die "Evolutionstheorie der 5 Phasen"

Aus den bisher besprochenen Befunden anderer Autoren, den Gedanken zur Unitäts- und Dualitätstheorie und den Ergebnissen der vorliegenden Studie läßt sich eine neue Theorie der Evolution des Gonadotropinsystems aufstellen. Hierzu sind jedoch noch einige allgemeine Vorbemerkungen notwendig.

Im Laufe der Entwicklung kann bei einem hypophysären Hormonsystem auf mindestens drei Ebenen eine Veränderung auftreten:

a) Hypophysenzellen (Syntheseort),
b) chemische Konfiguration des Hormonmoleküls und
c) der Rezeptor im Zielorgan.

Diese drei "Wandlungsebenen", die wechselseitig voneinander abhängig ("interdependent") sind, beteiligen sich an einem spezifischen integrativen Mechanismus, der die Wirkung des Hormons zum Ausdruck bringt. Ändert sich eine "Wandlungsebene", so kann sich auch die Hormonwirkung entsprechend verändern; z.B. das Säuger-Prolaktin

ruft bei Fischen die Schleimzellenvermehrung, bei Vögeln die Kropfmilchbildung und bei Säugetieren die Laktation hervor. Klassische Beispiele einer adaptativen molekularen Evolution sind die neurohypophysären Hormone, die bei den Süßwasserfischen eine Wasserausscheidung (Diurese) und bei den terrestrischen Wirbeltieren eine Wasserretention (Antidiurese) induzieren (MAETZ 1968). Aufgrund der Evolution können nicht nur die einzelnen Hormone, sondern auch eine "zwischenhormonale Integration" eine Änderung, ja sogar eine Umwandlung vollziehen. So verhalten sich Gonadotropine und Prolaktin bei Fischen antagonistisch (BLÜM u. FIEDLER 1965), bei Säugetieren jedoch synergistisch (TURNER u. BAGNARA 1971). Hierzu sollte die Abhängigkeit des Hormonsystems vom Zentralnervensystem (ZNS) betont werden: Die in den übergeordneten Neuronen des ZNS vorhandenen "Informationen" spielen bei der biologischen Wirkung eines Hormons eine entscheidende Rolle.

Alle drei Wandlungsebenen können sich unabhängig voneinander - auch zeitlich unabhängig - entwickeln. Berücksichtigt man bei niederen Vertebraten die palaeontologischen Entwicklungen, die funktionellen Divergenzen, die unterschiedlichen Arten der Fortpflanzung, die ethologischen Aspekte und die Anpassungsfähigkeit an verschiedene ökologische Bedingungen (wie Jahreszeit, Temperatur, Licht, Salinität etc.), so kann man die Existenz unterschiedlicher evolutionsbedingter endokrinologischer Modelle vermuten. Akzeptiert man nun die Hypothese der Unität oder der Dualität der Gonadotropine bei Fischen und Amphibien, so ist man mit einer "Entweder-Oder-Situation" konfrontiert, die im Hinblick auf die unterschiedlichen Befunde über die Gonadotropin-Zelltypen innerhalb einer Tiergruppe zu einer "Sackgasse" bei der Interpretation führt. Die Auffassung, daß ein und dasselbe Hormonsystem (entweder Unität oder Dualität) in sämtlichen Gruppen der niederen Ver-

tebraten fungiert, ist nicht nur unvorsichtig, sondern auch mit der Vielseitigkeit der niederen Wirbeltiere nicht zu vereinbaren. Diese Überlegungen führen den Autor zur folgenden Theorie:

> Die Evolution des gonadotropen Hormonsystems der niederen Wirbeltiere vollzog sich in 5 Phasen, die die drei Wandlungsebenen (- Syntheseort, Hormonmolekül, adäquater Rezeptor -) beinhalten:
>
> Phase I: Ein Gonadotropinzelltyp synthetisiert ein Glykoprotein; die Gonaden bilden einen adäquaten Rezeptor aus. Dieses System stellt das Ausgangsstadium dar, das "Primitivgonadotropin-System."
>
> Phase II: Ein Gonadotropinzelltyp synthetisiert ebenfalls ein Glykoprotein; die Gonaden besitzen jedoch zwei auf verschiedene physiologische Phänomene spezialisierte adäquate Rezeptoren, die die biologische Wirkung des einen Hormons in den Gonaden differenzieren. Es ist ein "Zwischengonadotropin-System" auf der Rezeptorebene entstanden.
>
> Phase III: Zwei verschiedene Gonadotropinzelltypen produzieren gemeinsam ein gleichartiges Glykoprotein; in den Gonaden ist ein adäquater Rezeptor vorhanden. Auch hier liegt ein "Zwischengonadotropin-System" vor; hier jedoch auf der Ebene des Syntheseortes.
>
> Phase IV: Zwei verschiedene Gonadotropinzelltypen synthetisieren zwei verschiedene Glykoproteine. In den Gonaden ist jedoch nur ein Rezeptor vorhanden. Dieses "Zwischengonadotropin-System" liegt auf der Ebene des Hormonmoleküls.

Phase V: Zwei verschiedene Gonadotropinzelltypen produzieren zwei verschiedene Glykoproteine; in den Gonaden sind zwei adäquate Rezeptortypen vorhanden, die jeweils auf eine der beiden Glykoproteine spezialisiert sind. Dies stellt die gegenwärtig höchstentwickelte Evolutionsstufe dar: Ein "Differenziertes Gonadotropin-System", das durch Wandlungen auf allen drei Ebenen entstanden ist.

Phase I stellt, wie erwähnt, die Ausgangsbasis dar. Phasen I - IV sprechen für die Unität der Gonadotropine. Phase II ähnelt dem 2-Rezeptormodell von BURZAWA u. FONTAINE (1972) (s. 2.h. dieses Kapitels). Die Phasen II, III und IV können als "Zwischenphasen" der Evolution des Gonadotropinsystems der Vertebraten betrachtet werden; deshalb wird in diesen Phasen vorkommendes Hormon als "Zwischengonadotropin" bezeichnet. Phase V, die gegenwärtig höchstentwickelte Form der Evolution, stimmt mit dem Dualitätskonzept überein.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können Carassius auratus und Rana esculenta der Phase V zugeordnet werden. Daß die Knochenfische und Anuren dieselbe Evolutionsphase erreicht haben, ist nicht erstaunlich, wenn man mitberücksichtigt, daß die beiden Tiergruppen sich unabhängig voneinander seit mehr als 500 Millionen Jahren entwickelt haben (BARRINGTON 1968). MAZZI et al. (1966) identifizierten bei Triturus cristatus carnifex zwei verschiedene Gonadotropin-Zelltypen; bei derselben Tierart zeigte der P^{32}-Bioassay in der vorliegenden Arbeit nur ein Gonadotropin. Daraus kann folgendes geschlossen werden:
a) Der Molch hat zwei Gonadotropinzelltypen, die ein Hormon synthetisieren, seine Gonaden bilden einen Rezeptor - also die Phase III, b) das Tier hat zwei Gonadotropinzelltypen, die zwei Hormone synthetisieren, die Gonaden enthalten einen Rezeptor - also die

Phase IV.

Die vorliegende "Evolutionstheorie der 5 Phasen" hat drei konkrete Vorteile vor der Unitäts- und Dualitätstheorie. Diese sind:

a) Die Unitätstheorie liefert keine Erklärung für das Vorkommen von zwei Gonadotropinzelltypen in einer Reihe der Knochenfisch- und Amphibienarten (s. 2.h. dieses Kapitels und REINBOTH 1972). Phasen III und IV der vorliegenden Hypothese erklären eine derartige Situation. Das Dualitätskonzept ignoriert ebenfalls die Befunde vieler Autoren, die nur einen Gonadotropinzelltyp bei niederen Wirbeltieren nachgewiesen haben (s. 2.h. dieses Kapitels und BURZAWA u. FONTAINE 1972). Phase II der vorliegenden Hypothese sieht die Differenzierung der gonadotropen Wirkung (z.B. zwischen gametogener und steroidogener) mit einem Gonadotropinzelltyp vor.

b) Wie aus den o.a. Erläuterungen bezüglich des Molchgonadotropins ersichtlich ist, erlaubt die vorliegende Theorie die Entfaltung der Wirkung eines Gonadotropinmoleküls, das in dem Tier seiner Herkunft inaktiv ist. Der Befund von FONTAINE (1969) über HTF (heterothyrotropic factors) ist ein schönes Beispiel dafür, daß tatsächlich in einem Hormonsystem derartige Fälle auftreten können (s. auch 2.g. dieses Kapitels). Es ist vermutlich auf die unterschiedliche Evolution der drei "Wandlungsebenen" zurückzuführen. Die Unitäts- und Dualitätstheorien sehen solche endokrinologischen "Möglichkeiten" nicht vor. Außerdem können die fünf Evolutionsphasen der vorliegenden Theorie eine genaue Interpretation der zoologischen Spezifität und der Artspezifität des Gonadotropinsystems liefern.

c) Die Vielseitigkeit der niederen Wirbeltiere (palaeontologische, ethologische und ökologische Aspekte, funktionelle Divergenz, mehrere Fortpflanzungsarten etc.) rechtfertigt die vorliegende Hypothese. Die

äußerst unterschiedlichen zoophysiologischen Zusammenhänge innerhalb der Vertebraten können nicht einsichtig werden, wenn man entweder die Unitäts- oder die Dualitätstheorie für allgemeingültig hält.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Während bei den höheren Vertebraten (Säuger, Vögel) bekannt ist, daß das gonadotrope Hormonsystem der Adenohypophyse von zwei verschiedenen Hormonen (Follikel-Stimulierendes Hormon, FSH; Luteinisierungshormon, LH) repräsentiert wird, ist diese Frage bei den niederen Wirbeltieren strittig. Bei Knochenfischen und Amphibien gibt es sowohl Hinweise für die Existenz zweier gonadotroper Hormone als auch nur für eines. In der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Klärung dieses Problems geleistet werden.

1. Es wurden Hypophysen aus insgesamt 600 Goldfischen (Carassius auratus gibelio BLOCH), 800 Kammolchen (Triturus cristatus carnifex LAURENTI) und 600 Teichfröschen (Rana esculenta LINNE) nach einer modifizierten Methode von ORNSTEIN (1964) und DAVIS (1964) durch Präparativ-Disk-Elektrophorese (7.5-%iges Gelsystem mit Tris-Glycin-Puffer pH 8.3) fraktioniert.

2. Die gonadotrope Wirkung der Hypophysenfraktionen wurde durch eine modifizierte P^{32}-Aufnahmemethode (BRENEMAN, ZELLER u. CREEK 1962) getestet.

3. Zwei Goldfischhypophysenfraktionen (Nr. I u. IV mit Rf-Werten 0.15 und 0.49) erzielten jeweils eine 282-%ige und eine 194-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Schwertträgerhoden.

4. Diese beiden gonadotropen Fraktionen der Goldfischhypophysen wurden an Schwertträgerhoden getestet und die Wirkung histologisch ausgewertet. Es konnte eine funktionelle Trennung der beiden Fraktionen erzielt werden. Eine Fraktion (Nr. I mit Rf-Wert 0.15) induzierte Spermiogenese und Spermiation,

außerdem aktivierte sie das Interstitium. Die zweite Fraktion (Nr. IV mit Rf-Wert 0.49) rief ebenfalls die Spermiogenese hervor, sie konnte aber weder das Interstitium noch Spermiation stimulieren.

5. In einem Vergleichsexperiment (- mit einem modifizierten Isolierungsverfahren -) konnte bei Karpfenhypophysen mit der P^{32}-Methode nur eine gonadotrope Fraktion mit einem Rf-Wert von 0.49 nachgewiesen werden.

6. Eine Fraktion der Kammolchhypophysen (Rf-Wert 0.08) induzierte eine 196-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme in Molchhoden.

7. Zwei Teichfroschhypophysenfraktionen (Nr. I und IV mit Rf-Werten 0.10 und 0.63) zeigten jeweils eine 46-%ige und eine 31-%ige Erhöhung der P^{32}-Aufnahme an Eintagskükenhoden.

8. Die beiden gonadotropen Fraktionen der Froschhypophysen wurden nach einem "Vesikularisierungsbioassay" (SIMON u. REINBOTH 1966) an juvenilen Hoden von Xenopus laevis DAUDIN getestet. Die Wirkung der beiden Fraktionen unterschied sich quantitativ. Eine Fraktion (Nr. IV mit Rf-Wert 0.63) war um den Faktor 3 wirksamer als die zweite Fraktion (Nr. I mit Rf-Wert 0.10).

9. Nach Ansicht des Autors kann weder die Unitätstheorie noch die Dualitätstheorie des Gonadotropinsystems für die sämtlichen Gruppen der niederen Wirbeltiere für allgemeingültig erklärt werden.

10. Der Autor stellt eine "Evolutionstheorie der 5 Phasen" für das Gonadotropinsystem der Vertebraten auf. Nach dieser Theorie vollzog sich die Evolution des Gonadotropinsystems in 5 Phasen, die die drei "Wandlungsebenen" (Syntheseort, Hormonmolekül u. adäquater Rezeptor) beinhalten.

VI. DANKVERMERKE

Herrn Prof. Dr. V. Blüm bin ich für die Anregung dieser Dissertation, für seine Ratschläge während der Untersuchungen und für die freundliche Betreuung der Arbeit sehr verbunden. Ich danke außerdem dem geschäftsführenden Direktor des Instituts für Tierphysiologie der Ruhr-Universität Bochum, Herrn Prof. Dr. H. Langer, für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und sein Interesse an dieser Arbeit. Herr Prof. Dr. Y.A. Fontaine, Museúm National D'Histoire Naturelle, PARIS, sandte mir dankenswerterweise Vergleichsmaterial aus Karpfenhypophysen.

Für die Erteilung eines Promotionsstipendiums möchte ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch dem National Institute of Health, Bethesda, Md., USA, das mir freundlicherweise das Hormonpräparat NIH-LH-S13 zur Verfügung stellte.

Herrn D. Prühs und Herrn H. Salmen bin ich für ihre kritischen Anmerkungen dankbar. Nicht zuletzt möchte ich Frau E. Schürmann und Frau I. Paas für das Schreiben des Manuskriptes und für die Anfertigung der Abbildungen herzlichst danken.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

BAGGERMAN, B. (1968): Hormonal Control of Reproductive and Parental Behaviour in Fishes. In: Perspectives in Endocrinology (E.J.W. Barrington and C.P. Jørgensen, ed.) pp. 351-404. Academic Press, London.

BALL, J.N., and B.I. BAKER (1969): The pituitary gland: anatomy and histophysiology. In: Fish Physiology (W.S. Hoar and D.J. Randall, ed.) Vol. 2, pp. 1-110. Academic Press, New York.

BARR, W.A. (1968): Pattern of ovarien activity. In: Perspectives in Endocrinology (E.J.W. Barrington and C.P. Jørgensen, ed.) pp. 163-257. Academic Press, New York.

BARRINGTON, E.J.W. (1968): Phylogenetic Perspectives in Vertebrate Endocrinology. In: Perspectives in Endocrinology (E.J.W. Barrington and C.P. Jørgensen, ed.) pp. 1-46. Academic Press, London.

BILLARD, R., E. BURZAWA-GERARD, u. B. BRETON (1970): Régéneration de la Spermatogenese du Cyprin hypophysectomise Carassius auratus L. par un facteur gonadotrope hautement purifié de Carp. C.R. Acad. Sci. D., 271, 1896-1899.

BILLARD, R., A. SOLARI, u. A.M. ESCAFFRE (1974): Les méthodes d'analyse quantitatives de la spermatogenese des poisson téléostéens. Ann.Biol.Anim.Biochim.Biophys. (im Druck).

BLÜM, V. (1974): Die Rolle des Prolaktins bei der Cichlidenbrutpflege. Fortschr. d. Zoologie 22, 2/3, 310-333.

BLÜM, V., und K. FIEDLER (1965): Hormonal control of reproductive behaviour in some cichlid fish. Gen.Comp.Endocrinol. 5, 186-196.

BRENEMAN, W.R. (1973): Bioassay of thyrotropin in chicks with simultaneous estimation of gonadotropin. Gen.Comp.Endocrinol. 20, 41-52.

BRENEMAN, W.R., F.J. ZELLER, und R.O. CREEK (1962): Radioactive phosphorus uptake by chick testes as an endpoint for gonadotropin assay. Endocrinology 71, 790-798.

BURZAWA-GERARD, E. (1971): Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, la carpe (Cyprinus carpio L.). Biochemie 53, 545-552.

BURZAWA-GERARD, E. (1974): Séparation et ré association des sousunités de l'hormone gonadotrope d'un poisson téléostéen, la Carpe (Cyprinus carpio L.). C.R. Acad. Sci. D. 279, 1681-1684.

BURZAWA-GERARD, E., und Y.A. FONTAINE (1965): Activités physiologiques d'un facteur hypophysaire gonadotrope purifié de poisson téléosteen. Gen.Comp.Endocrinol. 5, 87-95.

BURZAWA-GERARD, E., und Y.A. FONTAINE (1972): The gonadotropins of lower vertebrates. Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 3, 715-728.

CHANNING, C.P., LICHT, P., PAPKOFF, H., und E.M. DONALDSON (1974): Comparative activities of mammalian, reptilian and piscin gonadotropins in monkey granulosa cell cultures. Gen.Comp.Endocrinol. 22, 137-145.

CLEMENS, H.P., and F. GRANT (1964): The seminal thinning response of carp (Cyprinus carpio) and rainbow Trout (Salmo gairdnerii) after injections of Pituitary extracts. Copeia 2, 174-177.

DAVIS, B.J. (1964): Disc Electrophoreses. II. Method and Application to Serum Proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404-427.

DE KORT, E.J.M. (1971): Het interstitium in testis bij de groene kikker, Rana esculenta. Proefschrift, Rijksuniversiteit de Utrecht.

DODD, J.M. (1964): Endocrine patterns in the reproduction of lower vertebrates. Proc.Int.Congr.Endocrinol. 2nd, 124-130.

DODD, J.M. (1972): The endocrine regulation of gametogenesis and gonad maturation in fishes. Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 3, 675-687.

DONALDSON, E.M. (1973): Reproductive endocrinology of fishes. Amer.Zool. 13, 909-927.

DONALDSON, E.M., F. YAMAZAKI, H.M. DYE, und W.W. PHILLEO (1972): Preparation of gonadotropins from salmon (Onchorhynchus tshawytscha) pituitary glands. Gen.Comp.Endocrinol. 18, 468-481.

FIEDLER, K. (1974): Hormonale Kontrolle des Verhaltens bei Fischen. Fortschr. d. Zool. 22, 2/3, 268-309.

FONTAINE, Y.A. (1964): Characteristics of the Zoological Specificity of some Protein Hormones from Anterior Pitiutary. Nature 202, 1296-1298.

FONTAINE, Y.A. (1969): Studies on the heterothyrotropic activity of preparations of mammalian gonadotropins of teleost fish. Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 2, 417-424.

FONTAINE, Y.A., und M. CHAUVEL (1961): Evaluation du pouvoir gonadotrope de l'hypophyse des poissons téléostéens, et en particulier du Salmo salar L., á diverses étapes de son dévelopment et des migration. C.R.Acad.Sci.D. 257, 822-825.

FONTAINE, Y.A., E. BURZAWA-GERARD , und N. DELERUELEBELLE (1970): Stimulation hormonale de l'activité adénylcyclasique de l'ovaire d'un poisson téléostéen, le cyprin Carassius auratus L.
C.R.Acad.Sci.D. 271, 780-783.

GESCHWIND, I.I., u. C.H. LI (1958): The Reaction of several Protein Hormones with Periodate.
Endocrinol. 63, 449-459.

HARTREE, S.A., und F.J. CUNNINGHAM (1969): Purification of Chicken Pituitary Follicle Stimulating Hormon and Luteinizing Hormon.
J.Endocrinol. 53, 609-616.

HATTINGH, J., und P.J. DU TOIT (1973): Partial separation of the pituitary proteins of Labeo umsalus, SMITTON (Mudfish).
J.Fish Biol. 5, 41-47.

HOAR, W.S. (1962): Reproductive behaviour of fish.
Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 1, 206-216.

HOAR, W.S. (1965): Comparative Physiology: Hormones and Reproduction in Fishes.
Ann.Rev.Physiol. 27, 31-70.

HOAR, W.S. (1969): Reproduction. In: Fish Physiology W.S. Hoar and D.J. Randall, ed.)Vol. 3, pp. 1-70.
Academic Press, New York.

HYDER, M. (1970): Histological Studies on the Testis of Pond Specimen of Tilapia nigra (Günther) (Pisces: Cichlidae) and their Implication on the Pituitary-Testis Relationship.
Gen.Comp.Endocrinol. 14, 198-211.

HYDER, M. (1972): Endocrine regulation of reproduction in Tilapia.
Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 3, 729-740.

JALABERT, B., B. BRETON , und R. BILLARD (1974): Dosage biologique des hormones gonadotropes des poissons par le test de maturation in vitro des ovocytes de truité.
Ann.Biol.Anim.Biochim.Biophys. 14, 217-228.

JARVIK, E. (1965): Specialisation in Early Vertebrates.
Annls.Soc.roy.Zool.Belg. 94, 11-95.

KARLSON, P. (1970): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 277.

KASINATHAN, S., und S.L. BASU (1972): Effect of pituitary extracts on the spermatogenesis of green Frog, Rana hexadactyla LESSON.
Endocrinol. Japan 18, 59-67.

KRAMER, B. (1971): Zur hormonalen Steuerung von Verhaltensweisen der Fortpflanzung beim Sonnenbarsch Lepomis gibbosus (L.) (Centrarchidae, Teleostei).
Z.Tierpsychol. 28, 351-386.

KERR, T. (1965): Histology of the distal lobe of the pituitary of Xenopus laevis DAUDIN. Gen.Comp.Endocrinol. 5, 232-240.

KNOWLES, F., und L. VOLLRATH (1966): Cell types in the pituitary of the eel Anguilla anguilla L., at different stages of life cycle. Z.Zellforsch. Mikr.Anatom. 75, 317-327.

LEATHERLAND, J.F. (1972): Histophysiology and innervation of the pituitary gland of the goldfish, Carassius auratus L., a light and electron microscope investigation. Can.J.Zool. 50, 835-844.

LICHT, P. (1973): Induction of spermiation in anurans by mammalian pituitary gonadotropins and their subunits. Gen.Comp.Endocrinol. 20, 522-529.

LICHT, P., und H. PAPKOFF (1972): Relationship of sialic acid to the biological activity of vertebrate gonadotropins. Gen.Comp.Endocrinol. 18, 102-114.

LICHT, P., und H. PAPKOFF (1974): Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of the snapping turtle (Chelydra serpentina). Gen.Comp.Endocrinol. 22, 218-237.

LILEY, N.R. (1969): Hormones and reproductive behavior in fishes. In: Fish Physiology (W.S. Hoar and D.J. Randall, ed.) Vol. 3, pp. 73-116. Academic Press, New York.

LOFTS, B. (1968): Patterns of testicular activity. In: Perspectives in Endocrinology (E.J.W. Barrington and C.P. Jørgensen, ed.) pp. 239-304. Academic Press, New York.

MCBRIDE, J.R., und A.P. VAN OVERBEER (1969): Cytological changes in the pituitary gland of the adult sockeye salmon (oncorhynchus nerka) after gonadectomy. J.Fish Res. Board Can. 26, 1147-1156.

MAETH, J. (1968): Salt and Water Metabolism. In: Perspectives in Endocrinology (EJ.W. Barrington and C.P. Jørgensen, ed) pp. 47-163. Academic Press, London.

MATTHEIJ, J.A.M. (1970): The function of the basophilic cells in the mesoadenohypophysis of the heliad mexican cane fish, Anoptichthys jordani. J.Endocrinol. 48, 1xix.

MATTY, A.J. (1966): Endocrine glands in lower vertebrates. Int.Rev.Gen.Exp.Zool. 2, 43-138.

MAZZI, V., PEYROT, A., ANZALONE, M.R., und C. TOSCANO (1966): L'histophysiologie de l'adenohypophyse du triton créte (Triturus cristatus LAUR.). Z.Zellforsch. 27, 597-617.

MORRIS, B. (1965): Studies on Salt and Water Balance in Myxine glutinosa (L.).
J.Exp.Biol. 42, 359-371.

NICOLL, Ch.S. (1972): In Discussion, von BURZAWA u. FONTAINE (1972), S. 728.

NIEUWKOOP, P.D., and J. FABER (1956): Normal Table of Xenopus laevis.
North Holland Publ.Comp. Amsterdam, S. 137-188.

OLIVEREAU, M. (1962): Cytologie de l'hypophyse du cyprin (Carassius auratus L.).
C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. 255, 2007-2009.

OLIVEREAU, M. (1968): Etude cytologique de l'hypophyse du muge, en particulier in relation avec la salinité exterieure.
Z.Zellforsch. Mikr.Anat. 87, 545-561.

OLIVEREAU, M., und M. HERLANT (1960): Etude de l'hypophyse de l'anguille mâle au cours de la reproduction.
C.R. Soc. Biol. 154, 706-709.

OLIVEREAU, M., und G.J. RIDGEWAY (1962): Cytologie hypophysaire et antigene serique en relation avec la maturation sexuelle chez Oncorhynchus species.
C.R. Soc. Biol. 254, 753-755.

ORNSTEIN, L. (1964): Disc Electrophoresis I. Background and Theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349.

ORTMAN, R., SIRETT, N.E., COHEN, K.H., und M. DRUKER (1972): Bioassay studies of rostral and caudal halves of the pars distalis of Rana pipiens for adrenocorticotropin and gonadotropins.
Gen.Comp.Endocrinol. 19, 325-330.

OTSUKA, S.Q. (1956): On the extraction and bioassay of follicle stimulating and luteinizing substances on the salmon,
Endocrinol. Jap. 3, 272-277.

ÖZTAN, N. (1966): The fine structure of the adenohypophysis of Zoarces viviparus L.
Z.Zellforsch. Mikr. Anat. 69, 699-718.

PAPKOFF, H. (1972): Vertebrate reproduction - part I. Subunit interrelationships among the pituitary glycoprotein hormones.
Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 3, 609-616.

PICKFORD, G.E., und J.W. ATZ (1957): The Physiology of the Pituitary Gland of Fishes.
New York Zool. Soc., New York.

RAI, B.P. (1972): Gonadotrops in agnatha, fishes, and amphibia.
Acta Anat. 81, 42-52.

REDSHAW, M.R. (1972): The hormonal control of the amphibien ovary.
Amer.Zool. 12, 289-306.

REINBOTH, R. (1972): Hormonal control of the teleost ovary.
Amer.Zool. 12, 307-324.

ROBERTSON, O.H., und A.P. RINFRET (1957): Maturation of the infantile testis in rainbow trout produced by salmon pituitary gonadotropins administered in cholesterol pellets.
Endocrinol. 60, 559-562.

RUGE, I., und N. KACZMARCZYK (1967): Methoden der Löschkorrektur beim Flüssigkeits-Szintillationszählen.
Kerntechnik, Isotopentechnik u. Chemie 9, 399-406.

SAGE, M., und N.R. BROMAGE (1970): Interaction of the TSH and thyroid cells with the gonadotropic cells and gonads in poecilid fishes.
Gen.Comp.Endocrinol. 14, 137-140.

SAGE, M., und H. BERN (1971): Cytophysiology of the teleost pituitary.
Int.Rev.Cytol. 31, 339-379.

SCHMIDT, P.J., B.S. MITCHELL, M. SMITH, und H. TSUYUKI (1965): Pituitary hormones of pacific salmon I. Response of gonads in immature trout (Salmo gairdneri) to extracts of pituitary glands from adult pacific salmon (Oncorhynchus).
Gen.Comp.Endocrinol. 5, 197-206.

SCHREIBMAN, M.P., J.F. LEATHERLAND, und B.A. MCKEOWN (1973): Functional morphology of the teleost pituitary gland.
Amer.Zool. 13, 719-742.

SIMON, N. (1972): Experimentelle Untersuchungen zur Cytophysiologie und Cytomorphologie der Adenohypophyse und der neurosekretorischen Hypothalamuskerne von Lepomis (Centrarchidae).
Ph.D. Diss. Univ. Mainz.

SIMON, N., und R. REINBOTH (1966): Juvenile Anuren als Testobjekt für gonadotrope Hormone.
Verh.Dtsch.Zool.Ges., Zool.Anz. 30, 254-264.

SUNDARARAJ, B.I. (1959): A study of the correlation between the structure of the pituitary gland of the indian catfish Heteropneustes and the seasonal changes in the ovary.
Acta Anat. 37, 47-80.

SUNDARARAJ, B.I., und T.C. ANAND (1972): Effects of piscine and mammalian gonadotropins on gametogenesis in the catfish, Heteropneustes fossilis (BLOCH).
Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 3, 688-702.

SUNDARARAJ, B.I., T.C. ANAND, und V.R.P. SINHA (1972): Effects of carp pituitary fractions on vitellogenesis, ovarian maintenance, and ovulation in hypophysectomized catfish, Heteropneustes fossilis (BLOCH). J.Endocrinol. 54, 87-98.

SUNDARARAJ, B.I., S.K. NAYYER, T.C. ANAND, und E.M. DONALDSON (1971): Effects of salmon pituitary gonadotropin, ovine luteinizing hormone, and testosterone on the testes and seminal vesicles of hypophysectomized catfish, Heteropneustes fossilis (BLOCH). Gen.Comp.Endocrinol. 17, 73-82.

THRONTON, V.F. (1971): A bioassay for progesteron and gonadotropins based on the meiotic division of Xenopus oocytes in vitro. Gen.Comp.Endocrinol. 16, 599-605.

TURNER, C.D., und J.T. BAGNARA: General Endocrinology, (1971), S. 74-134, W.B. Saunders Comp., Philadelphia.

VAN OORDT, P.G.W.J. (1961): The gonadotropic producing and other cell types in the distal lobe of the commong frog, Rana temporaria. Gen.Comp.Endocrinol. 1, 364-374.

VAN OORDT, P.G.W.J. (1963): Cell Types in the pars distales of the amphibian pituitary. Coll.Int.CNRS Paris 128, 301-311.

VAN OORDT, P.G.W.J. (1968): The analysis and identification of the hormone-producing cells of the adenohypophysis. In: Perspectives in Endocrinology (E.J.W. Barrington and C.P. Jørgensen, ed.) pp. 405-460. Academic Press, New York.

WIEBE, J.P. (1972): On the mechanism and subcellular site of action of gonadotropins with respect to steroidogenic enzyme activity in testes of lower vertebrates. Gen.Comp.Endocrinol.Suppl. 3, 626-635.

YAMAZAKI, F. (1969): The Gonadotropin of Fishes. Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 35, 695-709. (Japanese). Trans. by Fish Res. Board Can. Trans. Ser. 1359.

YAMAZAKI, F., und E.M. DONALDSON (1968a): The spermiation of goldfish (Carassius auratus) as a bioassay for salmon (Oncorhynchus tshawytscha) gonadotropin. Gen.Comp.Endocrinol. 10, 383-391.

YAMAZAKI, F., und E.M. DONALDSON (1968b): The effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on spermatogenesis, vitellogenesis and ovulation in hypophysectomized goldfish, Carassius auratus. Gen.Comp.Endocrinol. 11, 292-299.

YAMAZAKI, F., und E.M. DONALDSON (1969): Involvement of gonadotropin and steroid hormones in the spermiation of the goldfish, Carassius auratus. Gen.Comp.Endocrinol. 12, 491-497.

LEBENSLAUF

24.05.1946	geboren als Sohn des Arztes Syed Manzoor Mahdi und der Ehefrau Sughra Fatima
1952-1957	Grundschulbesuch in Karachi (Pakistan)
1957-1962	Hauptschulbesuch in Karachi
1962-1964	Abitur an D.J. College, Karachi
1964-1967	Erwerb eines Grades des B.Sc. (Hons.) an der Universität Karachi
1967-1968	Erwerb eines Grades des M.Sc. an der Universität Karachi
Juni 1970	Erwerb eines Stipendiums vom Deutschen Akademischen Austauschdienst
Aug. 1971	Erwerb des Grades des Diplom-Biologen an der Ruhr-Universität Bochum
Nov. 1971	Beginn der Doktorarbeit bei Herrn Priv.-Doz. Dr. V. Blüm, Institut für Tierphysiologie der Ruhr-Universität Bochum